

EDISON NATAL FEDRIZZI

**PESQUISA DA PREVALÊNCIA DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
AMOSTRAS DE TECIDO
ENDOMETRIAL NORMAL E COM
CARCINOMA PELA TÉCNICA DE PCR**

**Dissertação apresentada como requisito à
Obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Tocoginecologia, Centro de
Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Newton Sérgio de
Carvalho**

CURITIBA

2003

Fedrizzi, Edison Natal

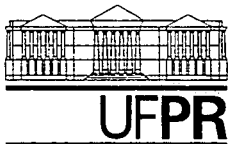
Pesquisa da prevalência do Papilomavírus humano (HPV) em amostras de tecido endometrial normal e com carcinoma pela técnica de PCR.

xviii, 117 f.

Orientador: Newton Sérgio de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1.Papilomavírus humano. 2. Carcinoma de Endométrio.3. Carcinogênese Endometrial



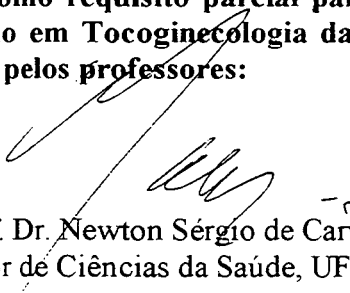
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências da Saúde
Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia
Maternidade do Hospital de Clínicas

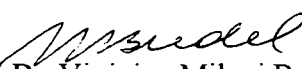
TERMO DE APROVAÇÃO

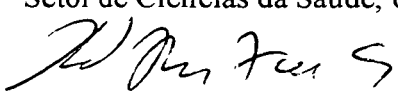
EDISON NATAL FEDRIZZI


**“PESQUISA DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) NO CARCINOMA DO
ENDOMÉTRIO”**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no
Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná,
pela Comissão formada pelos professores:**

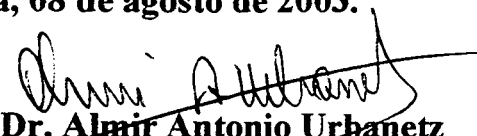
Orientador: 
Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho
Setor de Ciências da Saúde, UFPR

Examinadores: 
Prof. Dr. Vinicius Milani Budel
Setor de Ciências da Saúde, UFPR


Profa. Dra. Rita Maira Zanine Koslinski
Setor de Ciências da Saúde, UFPR


Profa. Dra. Luisa Lina Villa
Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer

Curitiba, 08 de agosto de 2003.


Prof. Dr. Almir Antonio Urbanetz
Coordenador do Programa

**“Preparar o futuro significa fundamentar
o presente”**

Saint Exupéry

*Dedico este trabalho às pessoas que mais amo:
À minha esposa **Denilza**, pelo incentivo a todo instante,
apesar das minhas inúmeras ausências e abdições.
Ao meu filho **Felipe** pelo seu jeito especial de ser.
Ao meu filho **Marcelo** pela luz que brilha em nosso lar.
A meus pais **Aventino** e **Laura** pela luta e sacrificio para
me tornar a pessoa que sou hoje.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Newton Sérgio de Carvalho, grande amigo, orientador e incentivador deste trabalho.

À Dra. Luisa Lina Villa, por sua sabedoria, amizade, humildade e realização dos exames de PCR.

À Dra. Irene Vieira, por sua dedicação na revisão e registro fotográfico dos casos.

Ao Prof. Dr. Aníbal Faúndes, grande mestre, incansável para ensinar, por todo aprendizado científico e de vida neste curso.

Aos demais professores do Curso de Mestrado pela experiência e transmissão dos conhecimentos.

Ao professor Dr. Rosires Pereira de Andrade, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia no período da realização deste trabalho, por todos os encontros de estudo, sempre agradáveis.

Ao professor Dr. Almir Antonio Urbanetz, atual Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia, pelo seu brilhante desempenho e dedicação ao Curso de Mestrado.

Aos colegas do Curso de Mestrado, pelos bons momentos vividos juntos.

Ao amigo Luiz Fernando Sommacal pelas intermináveis viagens para estudo e pelos momentos de descontração e lazer.

Aos Drs. Josué Lopes de Souza, Lee F-Ching (UFSC) e Sérgio Ossamu Ioshii (UFPR) pela separação do material anátomo-patológico para avaliação.

À Dra. Ana Paula Martins Sebastião pela amizade desenvolvida durante o curso e auxílio na seleção de casos para análise.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para mais esta conquista, meu muito obrigado !

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE SIGLAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	08
2.1 OBJETIVO GERAL	08
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	08
3. REVISÃO DA LITERATURA	09
3.1 EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA ENDOMETRIAL	09
3.2 ETIOPATOGENIA DO CARCINOMA ENDOMETRIAL	10
3.2.1 Mecanismos Moleculares da Oncogênese Endometrial	12
3.2.1.1 Mutação do gen p53	12
3.2.1.2 Instabilidade Microsatélite	13
3.2.1.3 Mutação do gen PTEN	13
3.2.1.4 Mutação do oncogen K-ras	14

3.2.2 Mecanismos Hormonais da Oncogênese Endometrial	14
3.2.2.1 Receptores hormonais	14
3.2.3 Resumo	15
3.3 FATORES DE RISCO E FATORES PROTETORES PARA O CARCINOMA ENDOMETRIAL	18
3.3.1 Fatores de Risco	18
3.3.1.1 Idade	18
3.3.1.2 Raça	18
3.3.1.3 Paridade	19
3.3.1.4 Alteração Menstrual	20
3.3.1.5 Dieta	21
3.3.1.6 Obesidade	21
3.3.1.7 Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus	22
3.3.1.8 Anovulação	23
3.3.1.9 Carcinoma Hormônio-Dependente	23
3.3.1.10 Estrogênios Exógenos	24
3.3.1.11 História Familiar	26
3.3.2 Fatores Protetores	26
3.3.2.1 Progestágenos	26
3.3.2.2 Tabagismo	28
3.3.3 Resumo	31

3.4 CARCINOGENESE GENITAL ASSOCIADA AO HPV	32
3.4.1 Etiologia	32
3.4.2 Epidemiologia	33
3.4.3 Cofatores	35
3.4.3.1 Tabagismo	35
3.4.3.2 Anticoncepcionais Hormonais	36
3.4.3.3 Paridade	37
3.4.3.4 Dieta	38
3.4.3.5 Outras Infecções	38
3.4.3.6 Imunossupressão	39
3.4.4 Patogênese	40
3.4.4.1 Genoma Viral	40
3.4.4.2 Oncoproteína E6 / Proteína p53	40
3.4.4.3 Oncoproteína E7 / Proteína pRb	43
3.4.4.4 Telomerase	43
3.4.4.5 Alteração Cromossômica	43
3.4.4.6 Perda da Heterozigosidade	44
3.4.4.7 Antígenos de Histocompatibilidade HLA	44
3.4.4.8 Angiogênese	44
3.4.5 Adenocarcinoma	45

3.5 HPV EXTRA-GENITAL	48
3.5.1 Trato Urinário	49
3.5.1.1 Uretra	49
3.5.1.2 Bexiga	49
3.5.1.3 Próstata	49
3.5.1.4 Rim e Ureter	50
3.5.2 Trato Aerodigestivo	50
3.5.2.1 Cavidade Oral	50
3.5.2.2 Laringe	51
3.5.2.3 Pulmão	51
3.5.2.4 Esôfago	52
3.5.2.5 Cólon, Reto e Ânus	52
3.5.3 Outros Locais	53
3.5.3.1 Conjuntiva e Saco Lacrimal	53
3.5.3.2 Sarcoma de Kaposi	53
3.6 PRESENÇA DO HPV NA CAVIDADE ENDOMETRIAL	54
3.7 ASSOCIAÇÃO DO HPV E O CARCINOMA ENDOMETRIAL	55
4. SUJEITOS E MÉTODOS	58
4.1 DESENHO (TIPO DE ESTUDO)	58
4.2 TAMANHO AMOSTRAL	58

4.3 SELEÇÃO DOS SUJEITOS	58
4.3.1 Casuística	58
4.3.2 Critérios de Inclusão	58
4.3.3 Critérios de Exclusão	59
4.4 VARIÁVEIS E CATEGORIAS	59
4.4.1 Variável Dependente	59
4.4.2 Variável Independente	60
4.4.3 Variáveis de Controle	60
4.5 PROCEDIMENTOS	66
4.6 COLETA DE DADOS	69
4.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS ..	69
4.8 ASPECTOS ÉTICOS	69
5. RESULTADOS	70
5.1 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS	70
5.2 ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DO HPV COM O CÂNCER DO ENDOMÉTRIO	72
5.3 INTERFERÊNCIA DA IDADE NA ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DO HPV E O CÂNCER DE ENDOMÉTRIO	73
5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE IDADE E PRESENÇA DO HPV EM TECIDO ENDOMETRIAL	74
5.5 INTERFERÊNCIA DO HÁBITO DE FUMAR NA PRESENÇA DO HPV EM TECIDO ENDOMETRIAL	75

5.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE A DIFERENCIAÇÃO ESCAMOSA E A PRESENÇA DO HPV EM TECIDO ENDOMETRIAL COM CÂNCER	77
5.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE O GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL E A PRESENÇA DO HPV EM TECIDO ENDOMETRIAL COM CÂNCER	77
5.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE O TROFISMO ENDOMETRIAL E A PRESENÇA DO HPV EM TECIDO ENDOMETRIAL NORMAL	78
5.9 TIPOS DE HPV ENCONTRADOS NO TECIDO ENDOMETRIAL NORMAL E COM CÂNCER	79
6. DISCUSSÃO	80
7. CONCLUSÕES	86
ANEXOS	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores peculiares aos 2 tipos de carcinoma endometrial	11
Tabela 2: Características tumorais associadas aos tipos 1 e 2 de carcinoma endometrial ..	11
Tabela 3: Risco Relativo (RR) para carcinoma endometrial de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC) e <i>status</i> menopausal	22
Tabela 4: Dose da terapia com estrógeno conjugado e risco de carcinoma endometrial	25
Tabela 5: Efeito dos metabólitos do fumo nos fenômenos associados ao estrógeno	28
Tabela 6: Tabagismo e risco de carcinoma endometrial	30
Tabela 7: Fatores de risco e protetores para carcinoma de endométrio	31
Tabela 8: Prevalência do DNA HPV nos carcinomas anogenitais (%)	33
Tabela 9: Risco relativo estimado (Odds Ratio) ajustados para a detecção de DNA HPV e câncer de colo uterino	35
Tabela 10: Frequência (%) da mutação de p53 nos carcinomas cervicais	41
Tabela 11: Localização da mutação p53 no carcinoma cervical	42
Tabela 12: Frequência do DNA HPV 16 e 18 por Hibridização e PCR nos casos de adenocarcinoma cervical	47
Tabela 13: Avaliação da idade e hábito do tabagismo entre as mulheres portadoras de carcinoma endometrial e grupo controle	70
Tabela 14: Resultado histopatológico dos carcinomas endometriais do grupo de estudo ..	71
Tabela 15: Indicação cirúrgica e resultado histopatológico do tecido endometrial do grupo controle	72
Tabela 16: Risco Relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV, segundo o diagnóstico histológico do endométrio	72

Tabela 17: Risco Relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV, segundo o diagnóstico histológico do endométrio em mulheres ≤ 50 anos	73
Tabela 18: Risco Relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV, segundo o diagnóstico histológico do endométrio em mulheres ≥ 50 anos	73
Tabela 19: Percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com carcinoma de endométrio, em relação a idade	74
Tabela 20: Percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres sem carcinoma de endométrio, em relação a idade	74
Tabela 21: Risco Relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV nas mulheres fumantes, segundo o diagnóstico histológico endometrial	75
Tabela 22: Risco Relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV nas mulheres não fumantes, segundo o diagnóstico histológico endometrial	75
Tabela 23: Percentual de mulheres com carcinoma endometrial, segundo a presença do HPV e tabagismo	76
Tabela 24: Percentual de mulheres sem carcinoma endometrial, segundo a presença do HPV e tabagismo	76
Tabela 25: Percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com carcinoma endometrial com e sem diferenciação escamosa	77
Tabela 26: Percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com carcinoma, segundo o grau de diferenciação nuclear	77
Tabela 27: Percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com carcinoma, segundo o grau de diferenciação arquitetural	78
Tabela 28: Percentual da presença do HPV em tecido endometrial normal, segundo o trofismo	78
Tabela 29: Risco Relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV em tecido endometrial, segundo o diagnóstico histológico e tipo viral	79
Tabela 30: Prevalência do DNA HPV em tecido endometrial normal e com carcinoma, de acordo com as técnicas de detecção viral utilizadas	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de carcinogênese endometrial dos tumores tipo 1 (Sherman, 2000)	16
Figura 2: Modelo de carcinogênese endometrial dos tumores tipo 2 (Sherman, 2000)	17
Figura 3: Carcinoma adenoescamoso: componente endometrióide (A) associado ao componente escamoso (B), ambos com características malignas (HE, 100x)	61
Figura 4: Adenocarcinoma endometrióide: glândulas endometriais com atipia nuclear (HE, 100x)	62
Figura 5: Adenocarcinoma seroso: (A) arranjo papilar de várias camadas de células com atipia nuclear (HE, 100x); (B) psamoma (detalhe) e atipia nuclear (HE, 400x) ..	63
Figura 6: Adenocarcinoma endometrióide grau citológico I (HE, 400x)	65
Figura 7: Adenocarcinoma endometrióide grau citológico II (HE, 400x)	65
Figura 8: Adenocarcinoma endometrióide grau citológico III (HE, 400x)	66
Figura 9: Técnica da realização do exame de PCR	68

LISTA DE SIGLAS

ACC	- Adenocarcinoma de Colo
ACI	- Anticoncepcionais Injetáveis
ACO	- Anticoncepcionais Orais
AI	- Adenocarcinoma Invasor
AIS	- Adenocarcinoma “in situ”
CCEC	- Carcinoma de Colo Espinocelular
CDC	- Center for Disease Control
Cols	- Colaboradores
CP	- Colpocitologia
DM	- Diabetes Mellitus
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DST	- Doenças Sexualmente Transmissíveis
E ₁	- Estrona
E ₂	- 17-β-Estradiol
E ₃	- Estriol
EBV	- Epstein-Barr Vírus
EE	- Etinil-Estradiol
EM	- Extensão Menstrual
EUA	- Estados Unidos da América
Fem	- Feminino
FSH	- Hormônio Folículo Estimulante
G ₁	- Bem Diferenciado
G ₂	- Moderadamente Diferenciado
G ₃	- Pouco Diferenciado / Indiferenciado
HAS	- Hipertensão Arterial Sistêmica
HDb	- Hibridização Dot blot
His	- Hibridização “in situ”
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	- Papilomavírus Humano
HSV	- Vírus Herpes Simples
IC	- Intervalo de Confiança
IgG	- Imunoglobulina G
IM	- Instabilidade Microsatélite
IMC	- Índice de Massa Corporal
IARC	- International Agency for Research on Cancer

Is	- “In situ”
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
Inv	- Invasivo
LH	- Hormônio Luteinizante
Masc	- Masculino
MMAC	- Mutação em Múltiplos Cânceres Avançados
N/C	- Razão Núcleo/Citoplasma
NIC 1	- Neoplasia Intraepitelial Cervical Leve
NIC 2	- Neoplasia Intraepitelial Cervical Moderada
NIC 3	- Neoplasia Intraepitelial Cervical Severa
NS	- Não Significativo
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OR	- Odds Ratio
PC	- Computador
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PRb	- Proteína do Retinoblastoma
P53	- Proteína 53
RR	- Risco Relativo
S	- Significativo
SAME	- Serviço de Arquivo Médico
SBP	- Sociedade Brasileira de Patologia
SHBG	- Proteínas Carreadoras dos Hormônios Esteróides
SOP	- Síndrome dos Ovários Policísticos
TF	- Tumor Feminizante
TSP	- Trombospondina
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UFSC	- Universidade Federal de Santa Catarina

RESUMO

A ação do Papilomavírus humano (HPV) na oncogênese das lesões do trato genital inferior está bem definida. Alguns estudos tem demonstrado a presença do vírus no trato genital superior, particularmente no ovário e cavidade endometrial, sem no entanto, analisar qual a relação da presença do HPV e seu efeito nestes locais. O objetivo deste estudo foi estudar a possível associação da presença do Papilomavírus humano e a carcinogênese endometrial. Para isso, foram avaliadas mulheres com carcinoma endometrial, comparando com as mulheres com endométrio normal e a sua correlação com a idade, tabagismo, diferenciação escamosa e grau de diferenciação tumoral, tipo viral mais frequente e trofismo endometrial nas mulheres sem carcinoma. Trata-se de um estudo observacional do tipo caso-controle onde foram avaliadas 100 mulheres (50 com endométrio normal e 50 com carcinoma endometrial) quanto a presença do DNA HPV em amostra tecidual conservada em blocos de parafina, pelo método de PCR. O risco relativo estimado da presença do HPV foi o mesmo nas mulheres com e sem carcinoma endometrial. A presença do HPV não esteve correlacionada com a idade das mulheres, tabagismo, trofismo endometrial, diferenciação escamosa e grau de diferenciação tumoral. O HPV 16 e 18 (5 dos casos com tipo 16 e 4 com o tipo 18) foram os vírus mais frequentemente encontrados. Concluimos que o HPV está presente no tecido endometrial de mulheres com carcinoma endometrial na mesma proporção que nas com tecido endometrial normal, não demonstrando a possível associação deste vírus no desenvolvimento do carcinoma endometrial.

Palavras-chave: Papilomavírus humano; HPV; Oncogênese; Carcinoma endometrial.

ABSTRACT

The role of the human Papillomavirus (HPV) on the oncogenesis of the lesions of lower genital tract is very strong. Some studies have had detected the HPV in the upper genital tract, mainly ovary and endometrial cavity. Although, the relation of this viral infection and his effects in this sites is unknown yet. The aim of this study was to determine the relation among HPV and endometrial carcinogenesis. Then, we studied women with and without endometrial carcinoma. Factors as age, tabagism, squamous differentiation and tumoral grade of tumours, trophism of normal endometrial and HPV types detected in endometrial tissues was available too. This is an observational case control study with 100 women (50 with endometrial carcinoma and 50 with normal endometrial tissue) who was analyzed by HPV DNA in the samples of endometrial tissue in paraffinized blocks, using PCR technique. The estimate relative risk of presence of the HPV in the endometrial carcinoma and the normal endometrial tissue was the same. The presence of HPV wasn't associated with age, tabagism, endometrial trophism, squamous differentiation and tumoral grade. The HPV type more frequently detected was 16 and 18 (five cases with HPV 16 and four cases with HPV 18). The conclusion of this study was that the HPV was detected in endometrial tissue of women with endometrial cancer in the same proportion of the women with normal endometrium. The association of HPV DNA and endometrial carcinogenesis wasn't observed.

Key-words: human Papillomavirus; HPV; Carcinogenesis; Endometrial carcinoma.

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de endométrio é uma das afecções malignas de origem ginecológica mais comuns no mundo ocidental. Em muitos países, como nos EUA, é considerado o câncer ginecológico mais frequente. São diagnosticados aproximadamente 150 mil novos casos por ano no mundo. As mais altas taxas anuais de incidência, acima de 15/100 mil mulheres, são encontradas na América do Norte, Europa e Nova Zelândia. Esta doença é menos comum (abaixo de 5/100 mil mulheres por ano) em partes da Ásia e Oriente Médio (Muir e cols, 1987).

No Brasil ocupa a 5ª posição (2,7%) entre todas as neoplasias diagnosticadas na mulher e a 3ª de causa ginecológica (após o colo uterino e mama). A maior incidência anual é observada em São Paulo (14/100 mil), equivalente a um risco acumulado de 0,8% ou 1 em 125 mulheres que chegam a completar 74 anos de vida (Mirra & Franco, 1985).

Foi estimado que 36.100 novos casos de carcinoma endometrial foram diagnosticados e que 6.500 mulheres morreram por esta doença nos EUA durante o ano de 2.000. A taxa de mortalidade ajustada nos EUA é de 6/100 mil mulheres negras, contra 3,3/100 mil mulheres brancas. A sobrevida média deste tumor é de 63-65 % em 5 anos (Greenlee e cols, 2.000).

O adenocarcinoma de endométrio é classicamente uma doença de mulheres com maior faixa etária, pós-menopausadas (75% dos casos). Entretanto, aproximadamente 25% dos casos são diagnosticados antes da menopausa e 2-14% abaixo dos 45 anos. Os fatores de risco citados para esta neoplasia não são tão evidentes para estas mulheres mais jovens (Henderson e cols, 1983; Gallup & Stock, 1984; Jeffery e cols, 1987; Parslov e cols, 2000).

Silveberg e cols, em 1972, constataram um aumento na incidência do carcinoma adenoescamoso nos últimos anos do estudo, com extrema gravidade do tumor, falta de resposta à radioterapia e baixa sobrevida em 5 anos. Estudos sistemáticos realizados na década de 80 tem demonstrado diferentes características epidemiológicas,

cl clinicopatológicas e moleculares nas mulheres portadoras do carcinoma endometrial, associados à idade, tipo histológico e agressividade que, possivelmente, estão relacionados a diferentes etiologias (La Vecchia e cols, 1982; Gambrel, 1982).

O carcinoma de endométrio compreende vários subtipos, cada qual com seu próprio padrão de comportamento e evolução. O adenocarcinoma endometrióide, também designado apenas adenocarcinoma, é o tipo mais comum (60-70 % dos casos). O adenoacantoma (10-20%), o carcinoma adenoescamoso (10%), o adenocarcinoma seroso (8%) e o de células claras (1%) são considerados como variantes do adenocarcinoma endometrióide (Bacchi e cols, 1999). O adenoacantoma e o carcinoma adenoescamoso contém células escamosas associadas ao componente glandular. Nos adenoacantomas ou adenocarcinomas com metaplasia escamosa, o elemento escamoso parece citologicamente benigno e costuma ocorrer em tumores bem diferenciados. Por outro lado, os adenocarcinomas, cujo elemento escamoso parece citologicamente maligno, são designados como carcinomas adenoescamosos ou carcinomas mistos (Silverberg, 1981). O carcinoma epidermóide é um tumor extremamente raro no endométrio em sua forma pura e ocorre geralmente em pacientes idosas, sendo muito agressivo (Gambrel, 1982).

A incidência desta neoplasia é influenciada por muitos fatores de risco, particularmente por variáveis hormonais e reprodutivas. Obesidade, alteração do metabolismo dos carboidratos, nuliparidade, infertilidade, ciclos anovulatórios, menopausa tardia, hipertensão e estrogênioterapia isolada são considerados fatores de risco. Em contrapartida, o uso de anticoncepcionais orais combinados ou componentes hormonais contendo progesterona tendem a diminuir estes riscos (La Vecchia e cols, 1984; Ewertz e cols, 1988; Parazzini e cols, 1991; Brinton e cols, 1992; Levi e cols, 1992; Jick e cols, 1993; Brinton & Hoover, 1993).

Curiosamente um fator de diminuição do risco de carcinoma endometrial que merece destaque é o tabagismo. Lesko e cols, em 1985, relataram, em mulheres na pós-menopausa, diminuição em 50% no risco deste câncer em fumantes de mais de 25 cigarros por dia. A nicotina exerce estímulo nas enzimas microssomais oxidativas hepáticas, alterando a ligação do estrogênio aos receptores, além de inibir a conversão periférica de androgênios a estrogênios. A importância disso reside em que, nos casos de câncer do endométrio em fumantes, provavelmente haja uma menor dependência hormonal e conseqüentemente um

pior prognóstico, como ocorre com os carcinomas endometriais não-hormônios dependentes (Schaklin, 1978).

Com base neste perfil epidemiológico de associação a um componente hormonal, ganhou aceitação a hipótese de que a gênese da doença seria desencadeada pela ação proliferativa endometrial dos estrógenos sem o balanço promovido pela progesterona (Schaklin, 1978; Gambrel, 1982; Key & Pike, 1988). Entretanto, este perfil de risco não explica todos os casos desta doença. Especificamente, os estudos sugerem que o tipo histológico mais comum (o adenocarcinoma endometrióide) evolui de um endométrio hiperplásico por ação estrogênica excessiva e geralmente apresentam uma evolução clínica lenta.

Em contraste, a minoria dos carcinomas endometriais, melhor representados pelos tipos serosos, não estão associados aos fatores hormonais citados anteriormente. Desenvolvem-se principalmente em um endométrio inativo ou atrófico, com evolução clínica mais agressiva, em mulheres idosas (Bokhman, 1983; Cohen e cols, 1995) ou em mulheres mais jovens sem os distúrbios hormonais anteriores (Gallup & Stock, 1984). Baseado nisso, diversos autores tem proposto que há dois tipos de carcinoma endometrial:

- Tipo 1 (estrógeno-dependente), geralmente representado pelo adenocarcinoma endometrióide, associado ao hiperestrogenismo e hiperplasia endometrial. Ocorre com maior frequência em mulheres mais jovens, nulíparas, obesas e hipertensas; são de baixo grau histológico, bem diferenciados, ricos em receptores de estrogênio e progesterona, invadem superficialmente o miométrio e apresentam metástase ganglionar infrequente, baixa mortalidade e baixo risco, sendo portanto, de melhor prognóstico (La Vecchia e cols, 1982; Gambrel, 1982).

- Tipo 2 (não estrógeno-dependente), principalmente representado pelo adenocarcinoma seroso, não está associado com hiperestrogenismo ou hiperplasia. Ocorre geralmente em mulheres idosas, magras, multíparas e normotensas; são de alto grau histológico, geralmente indiferenciados, pobres em receptores hormonais, invadem profundamente o miométrio, apresentam metástase ganglionar mais freqüentemente, com alta mortalidade e alto risco e, portanto, são de pior prognóstico (Bokhman, 1983; Deligdisch & Holinka, 1986).

O carcinoma tipo 1 está associado a uma mutação nos genes supressores tumorais PTEN e dos oncogenes ras, enquanto que o tipo 2 está associado à mutação de p53 (Sherman, 1999).

Diferente do carcinoma do endométrio, já está bem estabelecido a relação do carcinoma epidermóide do colo uterino com a infecção pelo papillomavirus humano (HPV), presente em praticamente 100% dos casos. Evidências clínicas, epidemiológicas, morfológicas e de biologia molecular demonstram correlação importante entre o HPV e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais e invasoras do colo uterino (Pfister, 1987). Inicialmente relacionado às lesões escamosas, recentemente o HPV 18 foi associado ao adenocarcinoma endocervical (Milson & Friberg, 1983; Tase e cols, 1989; Hording e cols, 1992), cuja incidência duplicou nos últimos dez anos, quando comparado ao epidermóide (Samaratunga e cols, 1993; Tenti e cols, 1996; Iwasawa e cols, 1996; Uchiyama e cols, 1997; Anciaux e cols, 1997; Teshima e cols, 1997; Lee e cols, 1998; Ferguson e cols, 1998; Skyldberg e cols, 1999).

Estudando seu mecanismo oncogênico, observa-se que as proteínas E6 e E7, produzidas pelos vírus HPV de alto risco, são as responsáveis pela transformação maligna devido sua habilidade em ligar-se e inativar as proteínas p53 e do Retinoblastoma (pRb) do hospedeiro, respectivamente (Werness e cols, 1990; Scheffner e cols, 1991). Uma vez que as proteínas p53 e pRb são proteínas supressoras de tumor, inibindo a progressão do ciclo celular, sua inativação pelas proteínas virais E6 e E7 levam a uma desregulação dentro da célula na fase S. A proteína E6 inativa a função do p53 por um aumento na sua degradação, resultando num nível intracelular insuficiente desta proteína supressora tumoral (Howley, 1991). Na minoria dos cânceres cervicais que não são infectados com o HPV (ou não são detectados por serem desconhecidos), o p53 é inativado provavelmente por uma mutação. Assim, a inativação do p53, por ação do E6 ou mutação, parece ser o principal componente do processo de transformação maligna no câncer cervical (Park e cols, 1994).

O adenocarcinoma do colo uterino, antes representado por 5% dos casos, atualmente representa cerca de 20%, provavelmente relacionado também à infecção pelo HPV. Usando métodos de amplificação do DNA, como a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), diversos autores encontraram tanto nos adenocarcinomas “in situ” como nos invasores, uma positividade variável (até 64%), sendo alta a proporção do HPV

do tipo 18 (Tase e cols, 1989; Hording e cols, 1992; Samaratunga, 1993) e menos freqüentemente os tipos 16 e 33 (O'Leary e cols, 1997). Iwasawa e cols, em 1996, encontraram a presença do DNA do HPV em 92% dos casos de carcinoma epidermóide (78% HPV 16 e 16% HPV 18) e 75% dos casos de adenocarcinoma (17% HPV 16 e 56% HPV 18) do colo uterino

Muitas características biológicas das pacientes com adenocarcinoma de colo uterino são também encontradas em pacientes com adenocarcinoma de endométrio. Milson e cols, em 1983, encontraram um significativo maior número de casos de diabetes e nuligestação (conhecidos fatores de risco para o carcinoma endometrial) em pacientes com adenocarcinoma de colo uterino, quando comparadas ao grupo de carcinoma epidermóide.

Além do colo, a vulva também é um sítio freqüente da infecção pelo HPV. Enquanto as neoplasias intraepiteliais vulvares contém o HPV 16 em 80-90% das vezes, somente 30-50% dos tumores invasivos apresentam evidências da infecção HPV, sugerindo uma etiopatogenia diferente nos casos negativos para estes vírus (Toki e cols, 1991).

Armbruster-Moraes e cols em 1994 descreveram a presença do HPV no líquido amniótico de mulheres grávidas, demonstrando a sua capacidade de invadir a cavidade uterina.

Por outra parte, há vários estudos descritos na literatura evidenciando a presença do HPV em lesões malignas extragenitais como boca (Saito e cols, 1999), laringe (Caruso & Valentim, 1997), esôfago (Morgan e cols, 1997), intestino (Cobb, 1990), pulmão (Tsuhaiko e cols, 1998), rim (Kuwamara e cols, 1998), conjuntiva e saco lacrimal (Nakamura e cols, 1997), etc, demonstrando a capacidade deste vírus infectar tecidos diferentes do trato genital inferior.

Todas estas informações sugerem que é possível a presença do HPV em lesões endometriais, principalmente se levarmos em consideração o HPV 18 que apresenta capacidade infectante comprovada também no epitélio glandular endocervical (Tenti e cols, 1996; Anciaux e cols, 1997; Teshima e cols, 1997; Skildberg e cols, 1999; Lee e cols, 1998; Ferguson e cols, 1998). A presença de sequências de DNA do HPV no trato genital superior é ainda desconhecida, ou pelo menos muito pouco estudada. Poucos trabalhos avaliaram a presença do mesmo nos casos de adenocarcinomas ou adenoacantomas de endométrio (Hording e cols, 1997; Lininger, 1998).

A idade também pode ser um fator marcante na possível correlação do HPV ao carcinoma endometrial, uma vez que atualmente têm-se encontrado casos de adenocarcinoma endometrial em pacientes mais jovens, sem que o fator hormonal seja identificado como um risco importante. Correlacionando com o colo uterino, Uchiyama e cols (1997) encontraram que pacientes com adenocarcinoma de colo uterino e HPV (+) eram significativamente mais jovens que aquelas HPV (-) ($43 \pm 13,3$ anos versus $57 \pm 17,4$ anos).

Se avaliarmos as características biológicas e epidemiológicas do adenocarcinoma de colo uterino e endométrio, que são semelhantes, e o conhecimento atual de que as lesões cervicais glandulares estão associadas à infecção pelo HPV 16, 33 e principalmente o 18, podemos pensar na possibilidade de alguns casos de carcinoma endometrial também estarem relacionados à infecção por este vírus. Recentemente, alguns estudos tem pesquisado esta relação (Iwasawa e cols, 1996; Uchiyama e cols, 1997; Anciaux e cols, 1997; Teshima e cols, 1997; Hording e cols, 1997; O'Leary e cols, 1998; Lee e cols, 1998; Ferguson e cols, 1998; Skyldberg, 1999).

Lininger e cols, 1998, encontraram a presença do HPV em 2 de 6 pacientes com carcinoma de células transicionais de endométrio, todos do tipo 16. O'Leary e cols (1998) pesquisaram a presença do HPV através da técnica de PCR em 10 amostras de endométrio normais, 20 de adenocarcinomas, 41 de adenocarcinomas com metaplasia escamosa e 2 de carcinomas adenoescamosos. Não foi identificada nenhuma sequência de DNA HPV em tecido endometrial normal. Nos adenocarcinomas (do tipo endometrióide), o HPV foi identificado em 10% (2/20) dos casos (ambos HPV 11). Nos adenoacantomas, o HPV tipo 6 foi encontrado em 46% (19/41). Nos casos de carcinomas adenoescamosos, um caso mostrou a presença do HPV 6 e 33. A aparente segregação do HPV de baixo risco (tipo 6) associado ao epitélio metaplásico escamoso e o HPV de alto risco (tipo 33) com epitélio escamoso maligno levanta importante questão em relação ao papel do HPV em tumores epiteliais mistos do endométrio e sua relação na patogênese destas lesões extra-cervicais.

Concluindo, existem vários fatores clínicos, biológicos, epidemiológicos e genéticos que nos induzem a pensar na possibilidade do vírus HPV também estar relacionado com as lesões pré-invasivas e invasivas do endométrio, entretanto esta ainda é uma questão que está longe de ser respondida.

Com a finalidade de contribuir para a compreensão da possível relação entre o HPV e o câncer de endométrio, este estudo comparou 2 grupos de mulheres (50 com carcinoma de endométrio e 50 sem carcinoma) quanto a presença do vírus HPV em tecido endometrial, estudadas pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) em blocos fixados e conservados em parafina.

A avaliação da presença do HPV em mulheres com e sem carcinoma de endométrio poderá contribuir para esclarecer se este vírus está relacionado à etiologia desta doença e portanto, se será preciso adotar novas estratégias de diagnóstico, prevenção e tratamento destas neoplasias.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar a prevalência da presença do DNA do Papilomavirus humano pela técnica de PCR em amostras de tecido endometrial normal e com carcinoma endometrial de mulheres submetidas a tratamento cirúrgico (histerectomia) por carcinoma endometrial e doença benigna.

2.2 Específicos

- 1) Pesquisar a presença do HPV no tecido endometrial de mulheres com e sem carcinoma do endométrio.
- 2) Avaliar se há diferença na prevalência da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com e sem carcinoma do endométrio.
- 3) Verificar se há diferença no tipo de HPV detectado no tecido endometrial de mulheres com e sem carcinoma do endométrio.
- 4) Pesquisar quais os tipos de HPV detectados no tecido endometrial de mulheres com e sem carcinoma endometrial e seu percentual de ocorrência.
- 5) Avaliar se a idade e o hábito do tabagismo em mulheres portadoras ou não de carcinoma endometrial influenciam na presença do HPV no tecido endometrial.
- 6) Pesquisar se existe diferença na presença do HPV no tecido endometrial de mulheres com carcinoma do endométrio quanto a presença ou não de diferenciação escamosa e o grau de diferenciação tumoral (nuclear e arquitetural).
- 7) Avaliar se existe relação entre o trofismo endometrial de mulheres sem carcinoma e a presença do HPV.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA ENDOMETRIAL*

A incidência do carcinoma endometrial vem aumentando progressivamente e é, atualmente, considerada a neoplasia ginecológica mais freqüente nos países desenvolvidos. Este progressivo aumento talvez esteja associado a certos fatores como a maior longevidade (expectativa de vida), melhores condições nutricionais e obesidade, menor paridade, estrogênioterapia e ainda outros fatores desconhecidos (Wong e cols, 1993; Cavanagh e cols, 1999).

Nos EUA ocupa o 1º lugar em incidência e 2º em mortalidade, associado aos tumores do trato genital feminino (Mariani e cols, 2000). A taxa de incidência naquele país permaneceu estável em 20:100.000 mulheres/ano por várias décadas, aumentando nos últimos anos para 30:100.000 mulheres/ano com o advento da estrogênioterapia em mulheres pós-menopausadas (Sherman, 2000).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde (INCA, 1998), os tumores do corpo uterino ocupam a 6ª causa de neoplasia maligna da mulher no Brasil. A maior incidência anual é observada em São Paulo com 14:100.000 mulheres/ano, equivalente a um risco acumulado de 0,8% ou 1 entre cada 125 mulheres se viverem até os 74 anos. No sul do Brasil, a incidência é de 11:100.000 mulheres/ano (Franco, 1995).

O acometimento etário é mais comum após os 50 anos e raro antes dos 40. Dahlgren e cols, 1989 avaliaram 68 casos de carcinoma endometrial e 761 controles e demonstraram uma incidência estimada de 7:100.000 mulheres/ano na população dos 40 a 44 anos e de 22:100.000 nas mulheres de 45 a 49 anos. Para as mulheres com menos de 40 anos, Silverberg e Makowski, em 1975, encontraram uma incidência de 1:100.000 mulheres/ano. (Gambrell, 1982).

A diminuição da função ovariana na menopausa estimula a hipófise a produzir as gonadotrofinas. Estas, por sua vez, principalmente o hormônio luteinizante, estimulam o estroma ovariano e supra-renal para produzir androgênios, sobretudo a androstenediona e testosterona, que se convertem no tecido adiposo periférico em estrona e estradiol, respectivamente, mantendo um estado de hiperestrinismo, importante para o desenvolvimento do carcinoma endometrial (Gambrell, 1982)..

3.2 ETIOPATOGENIA DO CARCINOMA ENDOMETRIAL

Aceita-se, hoje, ser a hiperplasia endometrial com atipia uma lesão precursora do carcinoma endometrial, apesar de alguns casos estarem associados a um endométrio atrófico e não hiperplásico (Westhoff e cols, 2000).

Tanto o estrogênio natural quanto o sintético promovem a proliferação da célula endometrial. A atividade mitótica depende da afinidade com o receptor estrogênico e do tempo de retenção do complexo receptor no núcleo celular. Em relação ao endométrio, o estrógeno mais potente é a estrona (E_1), seguindo-se pelo 17- β -estradiol (E_2) e pelo etinil-estradiol (EE) e estriol (E_3), correlacionando-se com a maior propensão em formar catecol-estrógenos e radicais epóxidos. Os metabólitos dos estrógenos (catecol-estrogênios), por meio das quinonas e epóxidos, causariam dano ao DNA das células alvo, podendo tanto ativar os oncogenes como transformar os proto-oncogenes (Yager & Liehr, 1996). Geralmente a lesão maligna surge após 10 anos da hiperplasia.

Baseado em observações clínico-patológicas de 366 mulheres com carcinoma endometrial, durante 20 anos de estudo, Bokhan propôs que há 2 tipos principais de carcinoma endometrial: tipo 1, relacionado a um desequilíbrio hormonal e tipo 2, não-estrógeno associado. De acordo com estes modelos, o tipo 1 são tumores mais indolentes que estão associados com a hiperlipidemia, obesidade e sinais de hiperestrogenismo, tais como, anovulação crônica, infertilidade, menopausa tardia e hiperplasia endometrial e do estroma ovariano. Os tumores do tipo 2 não estão associados a estes fatores e são mais agressivos e não respondem à progesterona como os tumores tipo 1. Os tumores do tipo 1 são observados em 60-70% das pacientes. Deligdisch & Holinka, 1986 demonstraram que os níveis de receptores de progesterona, sabidamente aumentados por ação do estradiol, são significativamente maiores nos tumores tipo 1.

A tabela 1 mostra 11 fatores que caracterizam as peculiaridades do organismo e aspectos morfo-funcionais dos órgãos do sistema reprodutor com respeito às duas vias patogenéticas do carcinoma endometrial. Na tabela 2 observamos a influência dos tipos patogenéticos da doença nas peculiaridades do tumor.

Tabela 1: Fatores peculiares aos 2 tipos de carcinoma endometrial

FATORES	TIPO 1	TIPO 2
Menstruação	Sangramento anovulatório	Ciclos normais
Função Reprodutora	Infertilidade freqüente	Fertilidade normal
Menopausa	Geralmente > 50 anos	Geralmente < 50 anos
CP na pós-menopausa	Estrogênico	Hipo/Atrófico
Ovário	Hiperplasia / SOP/ TF	Fibrose
Endométrio vizinho	Hiperplasia	Atrófico
Miométrio	Mioma / Adenomiose	Sem alteração
Obesidade	Presente	Ausente
Hiperlipidemia	Presente	Ausente
Diabetes mellitus	Presente	Ausente
Hipertensão	Associado	Não associado

Obs: CP: colpocitologia; SOP: Síndrome dos Ovários Policísticos; TF: Tumor Feminizante
Bokhman J V. Gynecol Oncol 1983;15:10-7.

Tabela 2: Características tumorais associadas aos tipos 1 e 2 de carcinoma endometrial

CARACTERÍSTICA	TIPO 1	TIPO 2
Duração dos sintomas	Geralmente longa	Geralmente curta
Diferenciação tumoral	Freqüente G ₁ ou G ₂	Frequente G ₃
Invasão miometrial	Superficial	Profunda
Metástese linfonodal	Baixa	Alta
Sensibilidade a Progesterona	Alta	Baixa
Associação tumoral	Ovário / Mama / Cólon	Nenhuma
Prognóstico	Favorável	Desfavorável

Bokhman J V. Gynecol Oncol 1983;15:10-7.

Para classificar um caso como do tipo 1 é necessário a presença de 2 critérios: ter no mínimo metade dos fatores (tabela 1) e associação com distúrbios metabólicos e reprodutivos.

A idade da mulher e a diferenciação tumoral não são critérios para classificação, apesar dos tumores tipo 1 serem mais freqüentemente diferenciados que os tipo 2 (Bokhan, 1983). A diminuição da diferenciação tumoral e aumento da profundidade de invasão dos tumores tipo 2 resultam em alta freqüência de metástases e conseqüentemente um pior prognóstico (Bokhan, 1983).

Sherman e cols em 1997 avaliaram 328 carcinomas endometrióides e 26 carcinomas serosos e compararam com 320 controles, sem carcinoma endometrial. Nesta análise, a média de idade das mulheres com carcinoma seroso foi 6 anos superior às mulheres com

carcinoma endometrióide. Demonstraram ainda, que os fatores hormonais não estão associados aos tipos serosos, mas tanto o tabagismo quanto os anticoncepcionais combinados foram protetores para o carcinoma endometrióide e seroso.

Dados histopatológicos suportam a hipótese de uma via alternativa da carcinogênese endometrial não relacionada ao desequilíbrio hormonal. Hendrickson e cols, 1982, avaliando 256 tumores endometriais estágio I demonstraram uma agressividade e recidiva maior nas mulheres com carcinomas endometriais serosos que endometrióides e que estas características eram semelhantes aos carcinomas serosos de ovário, produzindo mais frequentemente ascite e carcinomatose peritoneal.

Kurman e cols, 1985 analisando 170 casos de hiperplasia endometrial afirmam que a hiperplasia endometrial atípica é o precursor imediato do carcinoma endometrióide, sugerindo que ambas afecções seriam responsivas ao tratamento com progestágeno, evitando a cirurgia. Ferency e cols em 1989 relataram que 80% das mulheres com hiperplasia sem atipia e 25% das com atipias respondem ao tratamento hormonal. Randall e Kurman confirmam esta hipótese em 1997 quando demonstram que 94% das hiperplasias atípicas e 75% dos carcinomas endometrióides iniciais em mulheres mais jovens foram tratados com sucesso com o uso de progesterona por um período de 3 a 18 meses, sendo que 5 engravidaram posteriormente. Estes trabalhos mostraram que a resposta à progesterona é maior nas mulheres mais jovens, demonstrando nestes casos apenas um desequilíbrio hormonal, com deficiência de progesterona, enquanto que nas mais idosas, provavelmente o mecanismo envolvido seja o excesso absoluto de estrogênio (Sherman, 2002).

Ambros e cols, 1995 demonstraram que 76% dos carcinomas serosos e apenas 29% dos carcinomas endometrióides foram associados com atrofia endometrial. Assim, é provável que o carcinoma endometrióide seja uma progressão da hiperplasia endometrial atípica e que o carcinoma seroso se desenvolva de uma lesão intraepitelial (carcinoma intraepitelial endometrial). Os autores mostraram a presença do carcinoma intraepitelial em 89% dos casos serosos, parecendo representar uma transformação maligna do endométrio atrófico. Tanto o carcinoma intraepitelial quanto o carcinoma seroso apresentam mutação do p53.

3.2.1 MECANISMOS MOLECULARES DA ONCOGÊNESE ENDOMETRIAL

3.2.1.1 MUTAÇÃO DO GEN *p53*

O gen supressor tumoral p53 é crucial no controle da apoptose (morte celular programada). Na presença de dano do DNA celular, a expressão de p53 bloqueia a progressão do ciclo celular, dando tempo para que haja a reparação do DNA. A hiperexpressão de p53 inicia o processo de morte celular. Proteínas que se ligam ao p53 ou a expressão de um p53 mutante bloqueiam esta função, resultando em uma contínua divisão celular levando ao aparecimento de uma lesão tumoral (Sheets & Yeh, 1997).

A proteína p53 original apresenta uma meia-vida curta, sendo geralmente indetectável nas células normais, enquanto que a proteína p53 mutante é mais estável e

freqüentemente ricamente detectável pelos métodos imunohistoquímicos (Sherman, 2000). Diferenças na classificação histopatológica, preparação de tecido fresco ou fixado, uso de diferentes anticorpos, diferentes critérios de determinação de positividade, entre outros fatores, fazem com que muitos resultados da pesquisa do p53 mutado seja conflitante (Bur e cols, 1992; Sherman e cols, 1995; Ambros e cols, 1996; Tashiro e cols, 1997).

A mutação no gen supressor tumoral p53 e o acúmulo da proteína p53 tem sido detectado em aproximadamente 90% dos carcinomas serosos e carcinoma intraepitelial endometrial, mas raramente no carcinoma endometrióide (Sherman e cols, 1995; Tashiro e cols, 1997). A maioria dos carcinomas endometrióides que expressam mutação de p53 são menos diferenciados (Sherman, 2000). Praticamente todas as hiperplasias endometriais tem sido negativas para esta mutação (Sherman, 2000).

3.2.1.2 INSTABILIDADE MICROSATÉLITE

Microsatélites são extensões pequenas e polimorfas de algumas unidades dispersas do DNA no genoma e que geralmente não são codificadas (Eschelman & Markowitz, 1998). A instabilidade microsatélite (IM) refere-se a alterações no tamanho destas seqüências repetidas no DNA tumoral (Ellenson, 2000). Inicialmente de causa obscura, a instabilidade microsatélite está atualmente associada a uma deficiência no processo de reparo de um erro no DNA celular. Este sistema de reparo do DNA é fundamental para a detecção e correção de erros de pares de bases que são resultados de uma síntese incorreta do DNA. Estas alterações representam um marcador de defeito no mecanismo de reparo do DNA que pode levar a múltiplas mutações em uma única célula, desenvolvendo o tumor (Loeb, 1994). A grande maioria dos casos de instabilidade microsatélite está associado a inativação de alguns gens humanos, principalmente o hMSH2 e hMLH1 (Ellenson, 2000).

A IM tem sido identificada em cerca de 20% dos carcinomas endometrióides e hiperplasias atípicas, mas praticamente nunca nos casos de tumores serosos (Mutter, 1996). Como esta alteração não é encontrada freqüentemente nos casos de hiperplasia que não evoluem para o carcinoma, acredita-se que possa ser um evento tardio na transição da hiperplasia para o carcinoma. Alguns casos são difíceis de se distinguir uma hiperplasia atípica de um carcinoma endometrial inicial grau I e a exata determinação de quando a IM ocorre, seria uma forma de diferenciação (Gurin e cols, 1999).

Catusus e cols, 1998, avaliando 42 casos de carcinoma endometrial detectaram a presença de IM em tumores serosos e endometrióides mistos, mas acredita-se que estas alterações estejam relacionadas ao componente endometrióide das lesões.

3.2.1.3 MUTAÇÃO DO GEN PTEN

PTEN é um gen supressor tumoral localizado dentro da região cromossômica 10q23, cuja mutação em células germinativas tem sido identificada em síndromes cancerosas hereditárias. Esta mutação tem sido identificada em 35-50% dos carcinomas endometrióides e em 20% dos casos de hiperplasia atípica, tanto aquelas que progridem para o carcinoma quanto as que não progridem (Maxwell e cols, 1998; Sherman, 2000). É o

gen mutado mais freqüente no carcinoma endometrial e pode ser um potente indicador precoce da progressão de uma hiperplasia ao carcinoma endometrial (Ellenson, 2000).

Levine e cols em 1998 demonstraram a presença de mutação do *PTEN* em mais de 86% dos carcinomas endometrióides com instabilidade microsatélite, sugerindo uma associação entre estas lesões.

Mutter e cols, 2000, usando anticorpos monoclonais demonstraram que 61% dos carcinomas perdem e 97% mostram no mínimo uma diminuição na expressão *PTEN*.

O isolamento de glândulas endometriais *PTEN*-negativas em um endométrio anovulatório pode ser a detecção da fase mais precoce da carcinogênese endometrial, mas a relevância clínica do diagnóstico destas pequenas lesões permanece ainda por ser determinado (Mutter, 2000).

A alteração do gen *PTEN*, também foi descrita nos casos de MMAC 1 (*Mutação em Múltiplos Cânceres Avançados 1*). Este nome se refere à associação da mutação do *PTEN* com comportamento agressivo na maioria dos tumores. Entretanto, nos carcinomas endometrióides, a mutação de *PTEN* tem se associado com carcinoma grau 1, tendo prognóstico favorável (Sherman, 2000).

3.2.1.4 MUTAÇÃO DO ONCOGEN *K-ras*

A mutação do oncogen *K-ras* tem sido identificada em aproximadamente 20% dos carcinomas endometrióides, mas não é encontrada nos tumores serosos (Caduff e cols, 1995). Esta mutação tem sido implicada também no desenvolvimento de hiperplasias atípicas. Os trabalhos sugerem que a mutação *K-ras* também pode ser um evento oncogênico inicial no carcinoma endometrial (Whang & Lee, 1997).

3.2.2 MECANISMOS HORMONAIS DA ONCOGÊNESE ENDOMETRIAL

3.2.2.1 RECEPTORES HORMONAIS

Os receptores de estrógeno e progesterona são freqüentemente identificados nas hiperplasias endometriais e carcinomas endometrióides, especialmente os de baixo grau (Nyholm e cols, 1992). Os carcinomas serosos e os carcinomas intraepiteliais endometriais são geralmente negativos para estes receptores. O interessante é que os carcinomas serosos e intraepiteliais endometriais são receptores negativos, mas o endométrio atrófico, onde estes tumores se assestam, são receptores positivos (Sherman, 2000).

As lesões pré-cancerosas e cancerosas são resultados de uma proliferação celular monoclonal. Os pólipos endometriais são um exemplo de lesão endometrial proliferativa monoclonal que tem sido excluídos como lesão pré-cancerosa por geralmente inativarem um cromossomo X diferente do associado ao carcinoma (Mutter, 2000).

3.2.3 RESUMO

Em resumo, as evidências moleculares suportam a existência de duas vias de carcinogênese endometrial. Os carcinomas endometrióides (Tipo 1) estão associados com mutação em *K-ras*, *PTEN* e instabilidade microsatélite, enquanto que os carcinomas serosos (Tipo 2) estariam associados apenas com a mutação do gen p53. A coerência dos dados moleculares entre os carcinomas e seus respectivos precursores sustentam a idéia de que a hiperplasia atípica seja o precursor imediato do carcinoma endometrióide e que o carcinoma intraepitelial endometrial o precursor do carcinoma seroso. Os modelos carcinogenéticos tipo 1 e 2 podem ser vistos nas figuras 1 e 2.

Como perspectiva, possivelmente em um futuro próximo, teremos a capacidade de analisar vários marcadores tumorais simultaneamente, obtendo fatores prognósticos importantes para decisão terapêutica e acompanhamento.

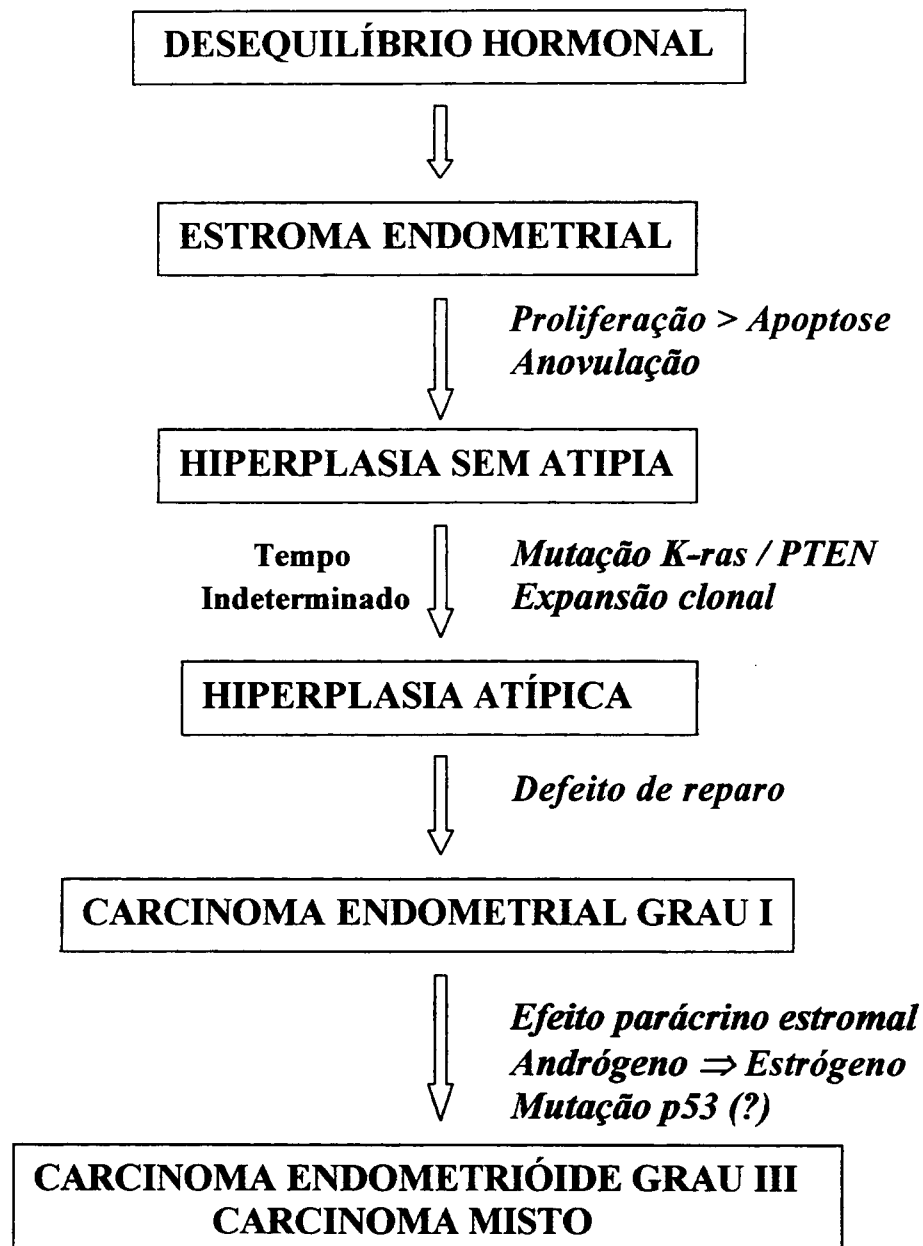
TIPO 1

Figura 1: Modelo de carcinogênese endometrial dos tumores tipo 1 (Sherman, 2000).

TIPO 2

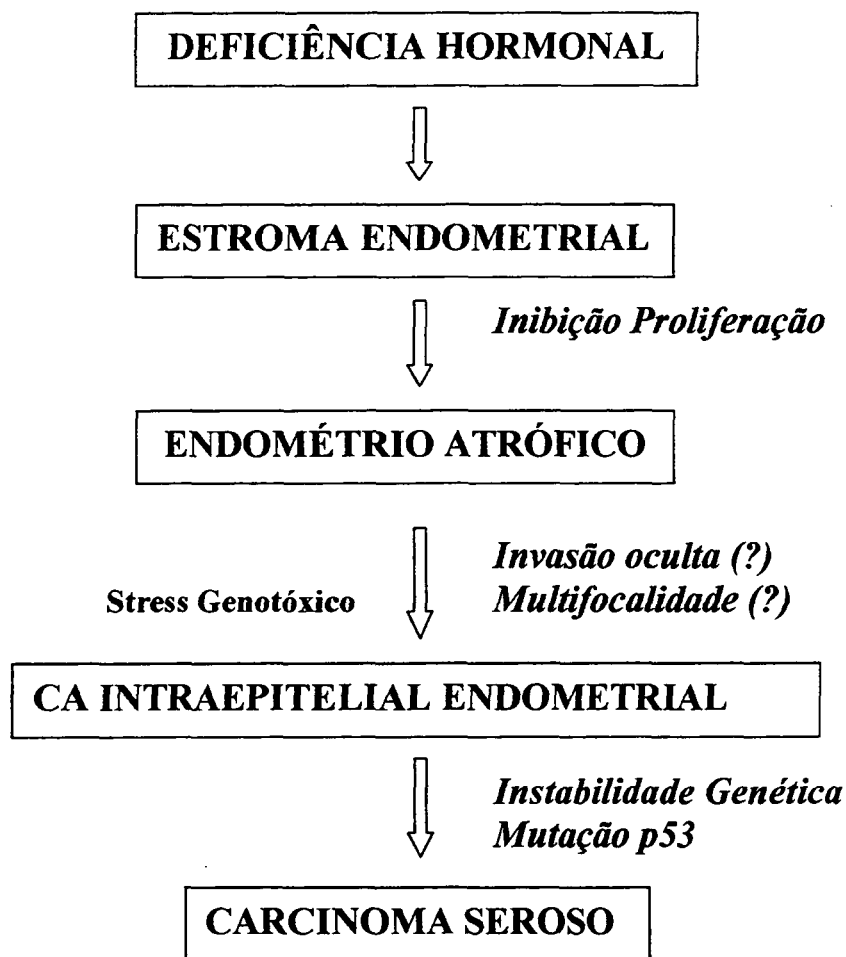


Figura 2: Modelo de carcinogênese endometrial dos tumores tipo 2 (Sherman, 2000).

3.3 FATORES DE RISCO E FATORES PROTETORES PARA O CARCINOMA ENDOMETRIAL

3.3.1 FATORES DE RISCO

3.3.1.1 IDADE

Quanto à idade, o acometimento é mais comum após os 50 anos e raro antes dos 40 (Parslov e cols, 2000). Gonçalves e Rodrigues de Lima, verificaram que 95,8% dos casos foram após os 50 anos. Excluindo os casos associados com os anticoncepcionais seqüenciais, em desuso, os adenocarcinomas endometriais em mulheres jovens (abaixo dos 40 anos) constituem cerca de 2-3% dos casos (Silverberg e cols, 1977; Jeffery e cols, 1987).

Crissman e cols em 1981 encontraram na revisão dos casos que 41% originalmente diagnosticados como carcinoma endometrial tinham um diagnóstico menor, como uma lesão intraepitelial ou atípias. Mulheres jovens, em idade reprodutiva que apresentam amostra endometrial sugestiva de adenocarcinoma, antes do tratamento definitivo, devem ter sua histologia revisada por um patologista com experiência em patologia maligna ginecológica.

Henderson e cols em 1983 avaliaram 127 mulheres com carcinoma endometrial e com 45 anos de idade ou menos e observaram que a obesidade era o fator mais importante, semelhante ao que acontece com as mulheres na pós-menopausa (La Vecchia e cols, 1982).

Gallup & Stock, 1984, avaliando 111 mulheres com carcinoma endometrial encontraram 14,4% em idade igual ou inferior a 40 anos. A paciente mais jovem apresentava 29 anos e 8 mulheres com 35 anos ou menos.

A associação da Síndrome dos Ovários Policísticos em 20-30% dos casos de adenocarcinoma endometrial em mulheres mais jovens demonstra que os fatores hormonais associados à anovulação crônica provavelmente apresentam um papel relevante na oncogênese nesta faixa etária (Jeffery e cols, 1987).

É possível que o carcinoma endometrial que ocorre na fase pré-menopáusia das mulheres seja diferente biologicamente do carcinoma encontrado em mulheres pós-menopausadas (Geisler e cols, 1969). Os trabalhos na literatura mostram que o adenocarcinoma endometrial em mulheres jovens está associado com doença em estágio inicial, alto grau de diferenciação e um bom prognóstico (Geisler e cols, 1969; Silverberg e cols, 1977; Gallup & Stock, 1984; Gitsch e cols, 1995).

3.3.1.2 RAÇA

Vários estudos tem investigado a diferença racial no risco e prognóstico do carcinoma endometrial. Mulheres negras tem apresentado maior incidência da doença (Sherman, 2000), estágios mais avançados (Bain e cols, 1987), menor diferenciação

tumoral (Hicks e cols, 1997), alterações histológicas menos favoráveis (Barret e cols, 1995) e tipos histológicos mais agressivos (Hill e cols, 1995).

Sherman, 2000 relata que a incidência do carcinoma endometrial é 60% maior em mulheres brancas, enquanto a mortalidade é 30% maior nas negras. Não está claro se esta mortalidade reflete as diferenças entre as raças quanto ao diagnóstico e tratamento ou a uma tendência das mulheres negras em desenvolver doença mais agressiva (OR=2,4 95% IC 1,2-3,8, segundo Barret e cols, 1995). Em nosso meio, a raça branca é a mais acometida com cerca de 88% (Gonçalves e Rodrigues de Lima, 2002).

Vários autores observaram que a mutação de p53 ocorre mais frequentemente nos tumores endometriais de mulheres negras. Estas alterações do p53 são eventos precoces na patogênese de tumores mais agressivos como os serosos (Barret e cols, 1995; Hill e cols, 1995; Kohler e cols, 1996).

É possível que outros fatores estejam associados, favorecendo o câncer endometrial nas mulheres negras. Connell e cols, 1999 relatam que geralmente a dieta das mulheres negras é mais rica em gorduras e menos em fibras. Estas diferenças podem afetar o sistema imunológico do hospedeiro ou alterar a proliferação das células tumorais.

Connell e cols, 1999, avaliaram 70 mulheres negras e 302 brancas com carcinoma endometrial e observaram que as mulheres negras tinham tumores menos diferenciados, características histológicas menos favoráveis. Após o tratamento, as mulheres negras tiveram um período de sobrevida livre de doença em 5 anos menor (52,8%) que as mulheres brancas (75,2%; $p=0,001$). Após controlado fatores clínico-patológicos e socio-econômicos em análise multivariada, a raça negra ainda permaneceu como um fator de pior prognóstico significativo (RR=2,0 95% IC 1,2-3,5).

3.3.1.3 PARIDADE

A função reprodutora da mulher exerce posição de destaque na carcinogênese do carcinoma endometrial. A nuliparidade foi o fator de risco mais importante (RR=2,8 95% IC 1,7-4,6) em um estudo caso-controle de 405 mulheres com carcinoma endometrial e 297 controles de Brinton e cols em 1992.

A associação da nuliparidade e o carcinoma endometrial pode ser explicada de várias formas. Por um lado, subentende-se serem mais frequentes os ciclos anovulatórios e, conseqüentemente, hiperestrogênicos. Além disso, durante cada ciclo grávido-puerperal, a mulher fica sob amplo predomínio hormonal da progesterona e do estriol, que se traduz a longo prazo em proteção para esta neoplasia (Kjellgren, 1977).

A idade do último parto exerce um fator protetor onde, as mulheres com parto após os 40 anos apresentam uma redução de 60% no risco para desenvolver este câncer. Isto reflete o benefício da exposição progesterônica do endométrio numa fase crítica de aparecimento das lesões carcinomatosas, por hiperestrinismo relativo à insuficiência luteínica (La Vecchia e cols, 1982; Parazzini e cols, 1991; Brinton e cols, 1992).

Henderson e cols, 1983, avaliando 127 mulheres com carcinoma endometrial com idade inferior ou igual a 45 anos, mostraram que o risco de câncer nestas mulheres é reduzido consideravelmente pelo aumento do número de gestações que chegaram ao termo. Parslov e cols, 2000 alerta que se todas as mulheres tivessem 2 ou mais filhos, cerca de 40% dos carcinomas endometriais nas mulheres pré-menopáusicas poderiam ser eliminados. Provavelmente isto esteja relacionado ao fato de que na gestação há um aumento da

atividade da dehidrogenase que converte o estradiol em estrona (biologicamente menos ativa) e diminui a concentração dos receptores de estradiol.

Parazzini e cols, 1991, porém, demonstraram que risco de carcinoma endometrial também ocorreu de acordo com o número de abortos espontâneos ou induzidos. Mulheres com 2 ou mais abortos tiveram um $RR= 0,5$ para os casos espontâneos e $RR= 0,3$ para os casos induzidos, ambos estatisticamente significativos. Parslov e cols, 2000 também mostraram proteção significativa contra o câncer endometrial em mulheres com aborto prévio (induzido ou espontâneo).

3.3.1.4 ALTERAÇÃO MENSTRUAL

A menarca precoce e a menopausa tardia aumentariam o tempo de exposição do endométrio aos estrógenos, aumentando o risco da doença. Estima-se que mulheres com menarca antes dos 12 anos de idade tenham elevação no risco para este tipo de câncer em 1,6 vezes e com menopausa após os 52 anos em 2,4 vezes (Abrão & Marques, 1995).

La Vecchia e cols, 1982, porém, não confirmam a associação de menarca precoce com câncer endometrial, mas mostram um aumento significativo do risco com aumento da idade da menopausa (69% dos casos estudados foram em mulheres com menopausa acima ou aos 50 anos). Ao contrário, Brinton e cols, 1992, avaliando 405 mulheres com carcinoma e 297 controles, demonstraram elevado risco para as mulheres com menarca precoce ($RR=2,4$ para idade < 12 vs ≥ 15 anos), mas nenhum risco para a menopausa tardia.

Henderson e cols, 1983 também mostraram não haver risco maior para o carcinoma endometrial em mulheres com menarca precoce ou duração do tempo da menarca e o estabelecimento de ciclos regulares. Da mesma forma Dahlgren e cols, 1989, avaliando 199 mulheres com carcinoma endometrial e 1.409 controles não encontraram associação destes tumores e alterações menstruais como a oligomenorréia.

Parslov e cols, 2000 analisando mulheres mais jovens com carcinoma endometrial (menos de 50 anos), não encontraram associação da menarca e câncer após ajustes nos fatores confundidores.

A principal fonte de estrógeno plasmático na mulher no menacme é a produção ovariana. Na pós-menopausa, a fonte primária de estrógenos é a conversão extraglandular de androstenediona a estrona e estradiol. Esta aromatização ocorre no tecido adiposo, que é particularmente rico em enzimas facilitadoras deste processo. Nas mulheres menopausadas a concentração plasmática de estrógenos está reduzida em 70-80% em relação ao nível do menacme (Parslov e cols, 2000).

Petterson e cols em 1986 descreveram o que denominaram de “Extensão Menstrual” (EM), traduzido pela seguinte fórmula:

$$EM = \text{Idade Menopausa} - \text{Idade Menarca} - (\text{Paridade} \times 1,5)$$

Os autores observaram que valores da $EM > 39$ correlacionavam-se ao risco de carcinoma endometrial 4,2 vezes maiores que mulheres com $EM < 25$ (Abrão & Marques, 1995).

3.3.1.5 DIETA

A relação entre os fatores dietéticos e o risco de carcinoma endometrial foi investigado em um estudo caso-controle com 274 casos de carcinoma endometrial e 572 controles por Levi e cols em 1993. Os autores mostraram que o consumo de proteínas animais, gordura e açúcar aumentava o risco de câncer (OR= 2,5), enquanto que frutas e grãos ricos em beta-caroteno e vitamina C eram protetores (risco reduzido em 40-60%). O consumo de álcool não esteve associado nem com risco aumentado, nem proteção para o carcinoma endometrial.

A quantidade e o tipo de dieta rica em gordura influencia o metabolismo de estrógeno, e estudos em animais e humanos tem estabelecido que a reabsorção de estrógeno no intestino está aumentada em função de dietas ricas em carne vermelha e gordura (Gorbach e Goldin, 1987). Além disso, há uma diminuição no nível de estradiol circulante em mulheres com dieta pobre em gorduras (Prentice e cols, 1990).

3.3.1.6 OBESIDADE

É clássica a associação do carcinoma de endométrio com a obesidade (21-80%), hipertensão (HAS) (16-78%) e diabetes mellitus (DM) (2-43%). Todavia, não há obrigatoriamente, a presença destes fatores com todos os carcinomas endometriais. Estas correlações clínicas são bastante discutíveis e alguns estudos prospectivos mostraram significância estatística apenas para HAS e DM (Elwood e cols, 1977; Galup & Stock, 1984; Ewertz e cols, 1988).

A obesidade, porém, leva a um aumento na produção periférica de estrona, da androstenediona e diminuição da concentração das proteínas carreadoras dos hormônios esteróides (SHBG), levando a um aumento na proporção de estradiol livre (Key & Pike, 1988). A localização da gordura na parte superior do corpo (obesidade abdominal ou andróide ou central), é a mais associada ao carcinoma. O tecido adiposo é uma fonte rica de aromatase, uma enzima que converte os andrógenos em estrógenos, logo, a obesidade confere um risco para a mulher na pós-menopausa pelo aumento da produção de estrógenos às custas dos andrógenos da adrenal e ovário. Além disso, as mulheres obesas apresentam uma diminuição importante das SHBG, levando a um aumento dos estrógenos periféricos e sua ação nos órgãos alvos (La Vecchia e cols, 1984).

Henderson e cols, 1983 e La Vecchia e cols, 1984 demonstraram que a obesidade é um fator extremamente importante (e talvez prevenível) associado ao carcinoma endometrial tanto na pré como na pós-menopausa. Levis e cols, 1992 observaram que a relação obesidade e carcinoma endometrial está associado com a idade da mulher (RR= 3,8 acima de 60 anos contra 2,7 em mulheres dos 40 aos 50 anos). Ballard-Barbash e cols, 1990, no entanto, concluíram que a obesidade pré-menopáusica aumenta o risco de carcinoma endometrial, enquanto que a obesidade pós-menopáusica aumenta o risco de carcinoma de mama. Key & Pike, 1988, porém, acham que o risco em relação à obesidade na fase pré-menopáusica não é devido a um aumento da concentração de estrogênio plasmático e sim uma deficiência nos níveis de progesterona.

La Vecchia e cols, 1982 demonstraram que 75% das mulheres com carcinoma endometrial estudadas apresentavam excesso de peso ou história de exposição a estrógenos, não anticoncepcionais. Um passado de obesidade também foi relevante.

Quanto maior a obesidade, maior o risco: para mulheres com 10-20 kg acima do peso ideal, o risco é de 3 vezes, enquanto para aquelas com peso maior que 25 kg, o risco é 10 vezes maior (Abrão & Marques, 1995).

La Vecchia e cols, 1984 demonstraram a relação entre o índice de massa corporal (IMC) e o risco para o carcinoma endometrial. O risco relativo nas mulheres com IMC ≥ 30 é de 20,3 para as mulheres pré-menopausadas e 7,6 para as menopausadas (Ver tabela 3).

Enquanto a grande maioria dos trabalhos demonstram um risco aumentado do carcinoma endometrial e obesidade, Paganini-Hill e cols, 1989, não encontraram nenhuma evidência de risco em paciente obesas. Parslov e cols, 2000 avaliaram mulheres abaixo de 50 anos com carcinoma endometrial e após controle de variáveis confundidoras de todos os outros riscos, também não mostraram risco maior da obesidade para o câncer endometrial nesta faixa etária.

Tabela 3: Risco Relativo (RR) para carcinoma endometrial de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC) e status menopausal

<i>IMC</i>	<i>Carcinoma</i>	<i>Controle</i>	<i>RR (95% IC)</i>	<i>p</i>
<i>Pré-menopausa</i>				
< 20	08	24	1,0	
20-24	21	49	1,5 (0,5-3,9)	NS
25-29	17	17	3,9 (1,2-12,9)	< 0,001
≥ 30	12	03	20,3 (4,0-103,5)	
<i>Pós-menopausa</i>				
< 20	16	90	1,0	
20-24	60	204	1,6 (0,9-2,9)	NS
25-29	74	125	3,3 (1,8-6,0)	< 0,001
≥ 30	72	52	7,6 (4,2-14,0)	

La Vecchia e cols. J Natl Câncer Inst 1984;73:667-71.

3.3.1.7 HIPERTENSÃO ARTERIAL E DIABETES MELLITUS

A correlação de carcinoma endometrial com a hipertensão e o diabetes tem sido muito discutida atualmente.

Quanto à hipertensão, sua ocorrência parece ser mais consequência do que causa do tumor. O simples fato de que grande parte dessas mulheres são obesas e apresentam idade superior a 50 anos favorece a própria hipertensão arterial. Por outro lado, a própria condição hiperestrogênica pode exercer estímulo no sistema renina-angiotensina-aldosterona, levando ao aumento da pressão arterial (Abrão & Marques, 1995).

Elwood e cols, em 1977 encontraram associação de ambos diabetes e HAS com o carcinoma endometrial mesmo após ajuste para o peso e status sócio-econômico. Entretanto, esta associação foi restrita às mulheres com diagnóstico recente, sugerindo um possível viés. Gallup & Stock, 1984, no entanto, encontraram correlação de HAS e/ou

diabetes e carcinoma endometrial mais frequentemente nas mulheres com idade acima de 40 anos. Ewertz e cols, 1988, também observaram a associação do carcinoma endometrial com HAS e sobrepeso, mas somente nas mulheres menopausadas (OR= 2,1).

Brinton e cols, 1992 demonstraram que a HAS, após ajuste do peso e outros fatores, não era um fator de risco significativo para o carcinoma endometrial, mas o diabetes sim, com um RR de 2,0 (95% IC 1,2-3,4). Parslov e cols, 2000 também demonstraram que a HAS não é um fator de risco independente para o carcinoma endometrial.

As alterações no metabolismo da glicose também parecem estar mais associadas às características epidemiológicas das mulheres com carcinoma de endométrio. O diabetes também tem maior ocorrência em mulheres obesas acima dos 50 anos, sobretudo se houver ação estrogênica no aumento da resistência periférica à insulina arterial (Dahlgren e cols, 1989; Abrão & Marques, 1995). As mulheres diabéticas geralmente apresentam níveis maiores de estrona e lipídios, favorecendo o aparecimento destes tumores (Henderson e cols, 1983).

Parslov e cols, 2000 não encontraram associação significativa entre o carcinoma endometrial e o diabetes. Entretanto o número de mulheres diabéticas no estudo foi muito pequeno (1,7%), impedindo conclusões mais sólidas.

3.3.1.8 ANOVULAÇÃO

Mulheres anovuladoras crônicas apresentam uma inadequada síntese de progesterona, diminuindo a ação antagonista aos estrógenos. As portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos apresentam ainda um estado de hiperandrogenismo, com maior conversão periférica em estrógenos. A elevação crônica dos níveis do hormônio luteinizante promove um aumento na produção da androstenediona pelo ovário, que é convertido em estrona no tecido periférico pela aromatase (Sherman, 2000).

Dahlgren e cols, 1989 e Brinton e cols, 1992 mostraram uma correlação de risco nas mulheres com hirsutismo e carcinoma endometrial. Brinton e cols evidenciaram que o desenvolvimento desta endocrinopatia em mulheres mais velhas (≥ 40 anos) apresentavam um RR de 2,0 (95% IC 1,2-3,4).

Em avaliação de 1.270 mulheres com anovulação crônica, La Vecchia e cols, 1984 encontraram um aumento de 3,1 vezes para o carcinoma endometrial.

Lucas & Yen, 1979 pesquisaram a relação de outras desordens metabólicas (hormônio do crescimento, insulina, prolactina, FSH e LH) e o carcinoma endometrial, mas não encontraram associação de risco.

3.3.1.9 CARCINOMA HORMÔNIO-DEPENDENTE

O carcinoma de mama e ovário também mostram uma correlação de risco para o carcinoma endometrial, provavelmente pelas implicações hormonais envolvidas (Bergman e cols, 2000).

Muitos trabalhos tem mostrado uma combinação entre o carcinoma endometrial e tumores funcionantes de ovário, principalmente os tecomas e tumores das células da granulosa. Todavia, sua infrequência impede a existência de grandes estatísticas que

caracterizem um claro perfil evolutivo desta doença, em associação com o tumor endometrial (Abrão & Marques, 1995).

O carcinoma de mama pode preceder ou seguir o endometrial por longo intervalo de tempo, até 10 anos ou mais. Por aproximadamente 20 anos o tamoxifeno tem sido o tratamento hormonal de escolha para o carcinoma de mama. Apesar da precisa indicação do seu uso, as mulheres usuárias desta medicação apresentam 2 a 7,5 vezes maior risco de desenvolverem carcinoma endometrial (van Leeuwen e cols, 1994; Cohen & Rahaman, 1995; EBCTCG, 1998). Embora esta droga seja considerada antiestrogênica, apresenta um efeito proliferativo endometrial com o uso prolongado. Bergman e cols, 2000, avaliaram 309 mulheres com câncer de endométrio pós-carcinoma de mama e 860 controles, apenas com carcinoma de mama e observaram um risco relativo de 1,5 (95% IC 1,1-2,0). O risco aumenta com o prolongamento do tratamento, com $RR=2,0$ (95% IC 1,2-3,2) para o uso de 2 a 5 anos e de 6,9 (95% IC 2,4-19,4) para as mulheres que usaram por mais de 5 anos. Este risco aumentado é tanto para os adenocarcinomas endometrióides como mesodérmicos e sarcomas. Infelizmente, o risco não diminui após a interrupção do tratamento e não é modificado por outros fatores de risco.

É possível, também, que o tamoxifeno tenha uma ação no dano do DNA celular, pois alguns trabalhos mostram o risco de carcinoma endometrial não só para os do tipo 1, mas também para os tipos 2. Entretanto, o mecanismo exato de indução ao câncer por estas drogas não está ainda estabelecido, apesar de haver uma hiperexpressão do p53 nos casos de carcinoma endometrial associado ao tamoxifeno, refletindo uma mutação genética (Carmichael e cols, 1996).

3.3.1.10 ESTROGÊNIOS EXÓGENOS

A associação entre estrogênioterapia e o risco de carcinoma endometrial tem sido exaustivamente abordada desde a década de 70, devido à administração inadvertida desses hormônios, sem o uso concomitante de progestagênios para o tratamento do climatério (Gambrell, 1982; Brinton e cols, 1992). Smith e cols, 1975 e Mack e cols, 1976 descreveram um aumento de 4,5 e 5,6 vezes, respectivamente, no risco de desenvolvimento dessa neoplasia entre usuárias de estrogênio, sem a devida oposição de progestogênios. Cifras maiores são relatadas por Paganini-Hill e cols, 1989 e Cohen e Rahaman, 1995, que mostraram um risco de 10 e 14 vezes, respectivamente, para as mulheres usuárias de estrógenos.

Vários estudos incriminaram os anticoncepcionais orais seqüenciais na gênese do carcinoma endometrial em mulheres jovens (Gambrell, 1982; Gallup & Stock, 1984; Silverberg e cols, 1977). Estes anticoncepcionais foram posteriormente removidos do mercado. Presumivelmente, o estrógeno isolado da primeira metade do ciclo era o fator estimulante endometrial, principalmente quando utilizado por longos anos.

Brinton e cols, 1993 avaliaram 300 mulheres menopausadas com carcinoma endometrial e 207 controles e observaram significativo aumento no risco de carcinoma endometrial ($RR=3,0$; 95% IC 1,7-5,1).

O uso prolongado de estrógenos aumenta o risco de desenvolver o câncer endometrial. Brinton e cols, 1983 demonstraram um Risco Relativo de 8,6 (95% IC 3,7-20,0) quando o tempo de uso foi superior ou igual a 5 anos e de 1,9 (95% IC 0,9-4,2) quando menos de 5 anos. Key & Pike, 1988, referem que o uso de terapia estrogênica

durante 5 anos aumenta a chance de câncer endometrial em 280%. O aumento do risco é de 10 vezes com uso da medicação por uma década de uso (Sherman, 2000). Paganini-Hill e cols, 1989 mostraram que mulheres que usaram estrógenos por 15 anos ou mais tiveram um risco relativo de 20 (95% IC 7,2-54) comparadas às não-usuárias. Quando em uso ou usuária recente (usou até 1 ano do início da pesquisa), este risco foi para 25 (95% IC 9,2-69).

A maioria dos estudos mostram que o risco de carcinoma endometrial associado à estrogênioterapia persiste por no mínimo 5 anos após a interrupção do uso, principalmente quando utilizado por longos períodos (Brinton e cols, 1983; Weiss e cols, 1979; Shapiro e cols, 1985). Paganini-Hill e cols, 1989 observaram que mulheres que usaram o estrógeno 15 ou mais anos atrás ainda tinham um aumento no risco (RR=5,8 95% IC 2,0-17).

O aumento do risco de câncer endometrial está associado tanto aos estrógenos conjugados como os não-conjugados (Mack e cols, 1976; Weiss e cols, 1979; Brinton e cols, 1983). Entretanto, alguns autores não encontraram risco maior com os estrógenos não-conjugados (Hulka e cols, 1980; Shapiro e cols, 1980).

Quanto à dose utilizada, alguns trabalhos (tabela 4) tem encontrado um risco mais elevado com doses maiores de estrógeno (Mack e cols, 1976; Weiss e cols, 1979; Rubin e cols, 1990). Entretanto, Brinton e cols, 1983 avaliaram o uso de estrógenos conjugados nas doses de 0,3, 0,625 e $\geq 1,25$ mg e observaram não haver diferença significativa no risco com diferentes doses (risco relativo de 2,8, 4,0 e 2,8, respectivamente).

Tabela 4: Dose da terapia com estrógeno conjugado e risco de carcinoma endometrial

<i>Autor</i>	<i>Ano</i>	<i>Casos</i>	<i>Controles</i>	<i>Dose (mg)</i>	<i>RR</i>
Mack e cols	1976	50	217	$\leq 0,625$	5,0
				$> 0,625$	9,4
Mc Donald e cols	1977	145	580	$\leq 0,625$	1,4
				$\geq 1,25$	7,2
Weiss e cols	1979	309	272	$< 1,25$	6,5
				$\geq 1,25$	7,6
Antunes e cols	1979	330	406	$\leq 0,625$	3,5
				$\geq 1,25$	6,1
Hulka e cols	1980	173	217	$\leq 0,625$	1,7-2,7
				$> 0,625$	0,6-3,2
Buring e cols	1986	177	396	$\leq 0,625$	2,7
				$\geq 1,25$	3,8

Key T J A & Pike MC. Br J Cancer 1988; 57:205-12, modificado.

3.3.1.11 HISTÓRIA FAMILIAR

Salmi em 1979, avaliando fatores de risco para o carcinoma endometrial na Finlândia mostrou um $RR= 2$ para as mulheres com história familiar de câncer uterino (endométrio e colo) .

Lynch e cols, 1994 pesquisaram três gerações de uma família, tentando observar uma associação com o carcinoma endometrial, mas não encontraram uma relação direta do câncer nos familiares. Entretanto, as mulheres portadoras de câncer colorectal apresentam uma maior predisposição ao carcinoma endometrial, associação denominada previamente pelos autores de Síndrome de Lynch II.

Parazzini e cols, 1994 avaliaram a associação entre a história familiar (primeiro grau) de carcinoma endometrial, mama e ovário em 726 casos de câncer endometrial e 2.123 controles. Os resultados sugeriram que a história familiar de câncer endometrial aumentava o risco da mesma doença. Entretanto, a proporção de casos atribuídos a este fator foi muito pequena: menos de 1% dos carcinomas endometriais nesta população foi atribuído a fatores familiares, potencialmente genéticos. Não houve relação de risco com a história familiar de câncer de mama ou ovário. Os mesmos autores citam um trabalho de Baanders-van de 1963 que mostrou um $RR= 5,0$ para as mulheres com história familiar de câncer endometrial.

Parslov e cols, 2000 analisaram 237 mulheres com carcinoma endometrial e 538 controles, todas com idade inferior a 50 anos e observaram que história familiar deste tipo de câncer em parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) era um fator de risco mesmo após o controle do índice de massa corporal ($OR=2,1$ 95% IC 1,1-3,8).

3.3.2 FATORES PROTETORES

3.3.2.1 PROGESTÁGENOS

Indiscutivelmente, o grande fator de proteção para o endométrio é a administração de progestogênios.. Por exemplo, os contraceptivos orais combinados, contendo progesterona, apresentam efeito direto na oposição aos estrógenos. Os progestogênios apresentam uma ação antagônica aos efeitos proliferativos dos estrogênios, competindo por seus receptores no endométrio e estimulando a enzima estradiol desidrogenase, que converte o estradiol em estrona . Este fenômeno determina intensa resposta pseudodecidual e supressão no crescimento endometrial (Tsen & Gurpide, 1975).

Observou-se que mulheres na pós-menopausa predispostas ao adenocarcinoma endometrial, pelo aumento dos estrógenos endógenos, podem ser identificadas pelo Teste da Progesterona e tratadas com progesterona cíclica por 10 dias por mês, evitando assim, o carcinoma de endométrio (Gambrell, 1982). Dois fatores podem aumentar a produção de estrógenos endógenos na mulher menopausada: 1) aumento na produção de androstenediona e 2) aumento da conversão periférica deste hormônio em estrona. Embora a quantidade de androstenediona produzida pela mulher menopausada seja a metade da produzida na pré-menopausa, a conversão da androstenediona em estrona na mulher

menopausada é 1 ½ vez que na pré-menopausada. O aumento da conversão da androstenediona em estrona também aumenta com a idade, obesidade, hepatopatia, hipertireoidismo, cardiopatia congestiva compensada, convalescença pós-operatória e subnutrição (Gambrell, 1982).

Parece não haver diferença quanto ao tempo de uso do anticoncepcional e o efeito protetor. Vários estudos caso-controles tem demonstrado que aproximadamente 1 ano de uso dos anticoncepcionais reduz o risco de desenvolvimento do câncer endometrial em cerca de 50% (Weiss & Sayvetz, 1980; Kaufman e cols, 1980; CDC & NICHD, 1987; Jick e cols, 1993). Alguns autores tem sugerido que a proteção é maior nas usuárias de anticoncepcionais por períodos mais prolongados, mas estas observações tem sido baseadas em um número pequeno de mulheres (Kaufman e cols, 1980; Hulka e cols, 1982; Henderson e cols, 1983).

O uso de anticoncepcionais orais combinados por mais de um ano consecutivo, leva a uma diminuição no risco, à custa de modificação no DNA celular, diminuição de células suscetíveis ao câncer, além do equilíbrio hormonal durante a exposição (Kaufman e cols, 1980; Hulka e cols, 1982). Resultado semelhante foi observado pelo "Estudo Colaborativo da OMS de Neoplasias e Contraceptivos Esteróides", publicados em 1988, avaliando 130 mulheres com carcinoma endometrial e 835 controles em 9 centros de pesquisa de 7 países, cujo Risco Relativo de carcinoma endometrial em mulheres usuárias de anticoncepcionais orais combinados foi de 0,55. O uso dos contraceptivos orais combinados por 5 anos diminui o risco de câncer endometrial em 60% (Key & Pike, 1988).

A dose do progestágeno pode, entretanto, não ser suficiente para inibir a proliferação endometrial em mulheres muito obesas (Henderson e cols, 1983) e nas mulheres que utilizaram a estrogênio-terapia após a menopausa por 3 ou mais anos (Weiss & Sayvetz, 1980). Caso a dose dos anticoncepcionais orais seja um fator importante na determinação da proteção, novas pesquisas deverão ser realizadas com os novos anovulatórios que apresentam cada dia doses menores de esteróides.

Jick e cols em 1993 examinaram a relação entre o uso prévio de anticoncepcionais orais e o câncer de endométrio em mulheres com idade entre 50-64 anos, sendo 142 com câncer e 1.042 controles. O Risco relativo para as ex-usuárias foi de 0,48 (95% IC 0,26-0,89), semelhante aos resultados anteriores. O efeito protetor do uso de anticoncepcionais persiste por no mínimo 15 anos após a parada do uso dos mesmos (CDC & NICHD, 1987).

Um fator a ser considerado é a associação da infertilidade e o carcinoma endometrial pelas alterações hormonais, principalmente associadas à anovulação. Estas mulheres, obviamente, utilizam menos freqüentemente qualquer método contraceptivo, inclusive os anticoncepcionais orais e isto poderia interferir na relação deste método e a menor chance do câncer endometrial (CDC & NICHD, 1987).

Em relação ao tipo histológico, poucos trabalhos avaliaram a correlação dos anticoncepcionais e os diferentes tipos de carcinoma endometrial. O efeito protetor parece ser similar sobre os adenocarcinomas, adenoacantomas e carcinomas adenoescamosos (CDC & NICHD, 1987).

Com relação à terapia de reposição hormonal, Voight e cols, 1991 demonstraram que a estrogênio-terapia esteve associada com um RR de 5,7 que diminuiu para 1,6 quando um progestágeno foi utilizado por no mínimo 6 meses.

3.3.2.2 TABAGISMO

O papel do fumo em relação ao carcinoma de endométrio não está claro. Existem três possibilidades de interferência. A primeira é que o tabagismo possa aumentar o risco das mulheres adquirirem esta doença. Mulheres que fumam tem um índice de mortalidade 20-30% maior que as que não fumam (Tyler e cols, 1985). Da mesma forma que existe a relação do fumo e aumento do risco de câncer do colo uterino, pela eliminação de substâncias carcinogênicas nas secreções genitais, o endométrio também estaria exposto a estas substâncias (Trevathan e cols, 1983).

A segunda possibilidade é que o tabagismo possa reduzir o risco desta neoplasia. Isto tem sido demonstrado em vários trabalhos na literatura (Weis e cols, 1980; Smith e cols, 1984; Lesko e cols, 1985; Lawewnce e cols, 1987; Stockwell e cols, 1987). Entretanto, uma vez que as mulheres fumantes apresentam uma menopausa em idade mais jovem que as não fumantes (Layde e cols, 1983) e que estudos em animais de laboratório demonstram uma atrofia ovariana precoce quando expostos aos constituintes do cigarro, é possível que o tabagismo diminua o risco de carcinoma endometrial por redução na produção de estrógenos (Tyler e cols, 1985).

A terceira possibilidade é que o fumo não tenha nenhuma influência no carcinoma endometrial. Isto pode ocorrer se os carcinógenos encontrados no cigarro não afetem as células endometriais (Tyler e cols, 1985).

Os mecanismos de interferência dos metabólitos do fumo sobre o perfil hormonal feminino pode ser avaliado na tabela 5.

Tabela 5: Efeito dos metabólitos do fumo nos fenômenos associados ao estrógeno

<i>Mecanismo</i>	<i>Metabólito do Fumo</i>
1. Diminuição da produção de estrógenos	
• Distúrbio na liberação das gonadotrofinas	Nicotina
• Atresia ovariana	Hidrocarbonos Aromáticos
• Inibição da Aromatase e outras enzimas	Nicotina / Monóxido Carbono
2. Alteração no metabolismo dos estrógenos	
• Mudança para catecol estrógenos	Hidrocarbonos Aromáticos
• Outros distúrbios metabólicos	Hidrocarbonos Aromáticos
3. Aumento da circulação de andrógenos	
• Estimulação da cortical adrenal	Nicotina
• Inibição de enzimas adrenais	Nicotina

Baron J A e cols. Am J Obstet Gynecol 1990;162:502-14.

Vários estudos tem mostrado que a menopausa ocorre cerca de 1,5 anos mais cedo em fumantes do que nas mulheres que nunca fumaram (Jick e cols, 1977; Baron e cols, 1990). Talvez a menopausa ocorra mais cedo também nas mulheres ex-fumantes do que nas que nunca fumaram, mas estes dados ainda são desconhecidos.

A relação entre o hábito de fumar e o risco de carcinoma endometrial já foi estudada por diversos pesquisadores, mas os resultados são conflitantes, alguns obtendo proteção e outros não (tabela 6).

Smith e cols, 1984 avaliaram o efeito do fumo no desenvolvimento do câncer de mama, ovário e endométrio. Concluíram que o tabagismo aumenta o risco de carcinoma endometrial nas mulheres pré-menopáusicas (RR= 1,27) e diminui nas mulheres pós-menopausadas (RR= 0,41). Trabalho semelhante foi realizado por Stockwell e cols, 1987 que mostraram uma clara redução no risco de carcinoma endometrial em mulheres com 50 anos ou mais e fumantes. O Risco foi significativamente reduzido nas fumantes moderadas (20-40 cigarros/dia) com OR=0,6 (95% IC 0,5-0,9) e fumantes pesadas (> 40 cigarros/dia) com OR=0,4 (95% IC 0,2-0,8).

Tyler e cols em 1985 avaliaram 437 mulheres com carcinoma endometrial e 3.200 controles entre 20 e 54 anos de idade e observaram nenhuma alteração no risco do carcinoma de endométrio e o hábito de fumar. O mesmo foi encontrado por Parslov e cols, 2000, avaliando 237 mulheres com carcinoma endometrial e 538 controles, todas com idade abaixo de 50 anos.

Devido a evidência de redução na excreção urinária de estrógeno em mulheres fumantes, Lesko e cols, 1985 avaliaram 510 mulheres com carcinoma endometrial e 727 controles (outros carcinomas). O risco relativo estimado para as mulheres na pós-menopausa fumantes de mais de 25 cigarros por dia foi de 0,5 (95% IC 0,2-0,9), ou seja, uma diminuição em 50% no risco deste câncer.

Esta relação do fumo foi melhor esclarecida por Lawrence e cols em 1987, que relacionaram este fator com o peso da mulher, afirmando que o risco relativo seria semelhante (1,0) em mulheres com menos de 63 kg, ao passo que seria de 5,6 para as mulheres com mais de 85 kg não fumantes e de 1,4 para o grupo com peso semelhante, mas fumantes. Justificaram este achado pelo fato de que a nicotina exerce um estímulo nas enzimas microsossomais oxidativas hepáticas, alterando a ligação do estrogênio às proteínas carreadoras, alterando a ligação do estrogênio aos receptores, além de inibir a conversão periférica de androgênios a estrogênios por inibição da aromatase.

Weir e cols, 1994 avaliaram 88 casos de carcinoma endometrial e 177 casos de hiperplasia adenomatosa e exposição ao fumo. Os resultados foram de que o fumo reduz de forma modesta o risco (não estatisticamente significativa) para a hiperplasia tanto em mulheres na pré como na pós-menopausa. Entretanto, para o carcinoma, houve uma redução do risco para as mulheres na pós-menopausa e um aumento do risco para as pré-menopáusicas.

Weiss e cols, 1980, notaram uma redução estatisticamente significativa no risco de carcinoma endometrial em mulheres ex-fumantes. Este efeito foi independente do número de cigarros fumados.

Tabela 6- Tabagismo e risco de carcinoma endometrial

<i>Autor</i>	<i>Ano</i>	<i>(n)</i>		<i>OR</i>	<i>p</i>
		<i>Casos</i>	<i>Controles</i>		
Von Lau e cols	1975	407	450	0,6	S
Weiss e cols	1980	322	289	0,4	S
Smith e cols	1984	70	612	0,8	NS
Tyler e cols	1985	437	3.200	0,8	NS
Lesko e cols	1985	510	727	0,7	S
Baron e cols	1986	476	2.128	0,6	S
Zemla e cols	1986	173	346	?	S
Franks e cols	1987	79	416	0,5	S
Lawrence e cols	1987	200	200	0,7-0,5	S
Stockwell & Lyman	1987	1.374	3.921	0,9-0,6	NS/S
Levi e cols	1987	357	1.122	0,5	S
Lawrence e cols	1989	84	168	0,6-0,9	NS
Koumantaki e cols	1989	83	164	0,5	S
Paganini-Hill e cols	1989	50	5.160	0,38	S

NS: não significativo; S: significativo

Baron J A, La Vecchia C, Levi F. Am J Obstet Gynecol 1990;162:502-14, modificado

Vários autores, porém, são unânimes em alertar que estes resultados não apresentam uma importância direta na saúde pública, uma vez que o hábito do tabagismo está associado a um grande número de doenças neoplásicas e não-neoplásicas. Entretanto, se estes resultados forem confirmados e o mecanismo de ação deste fator for completamente elucidado, poderá ser interessante e útil no desenvolvimento de estratégias para prevenção do carcinoma endometrial (Lesko e cols, 1985).

3.3.3 RESUMO

A maior parte dos fatores associados com o risco do carcinoma endometrial leva em consideração a ação destes fatores sobre o perfil hormonal das mulheres. Fatores de risco como a estrogenerapia, anovulação, nuliparidade, obesidade, menarca precoce, menopausa tardia, diabetes, entre outros, estão associados direta ou indiretamente a um aumento dos níveis de estrógenos. Em contraste, os contraceptivos hormonais combinados, tabagismo e fatores dietéticos parecem influenciar de forma qualitativa ou quantitativa os efeitos estrogênicos, reduzindo o risco.

Globalmente, estima-se que estes fatores de risco estejam associados a aproximadamente 30-60% dos casos de câncer endometrial (Parazzini e cols, 1991). Entretanto, a estrogenerapia e a obesidade são considerados os principais fatores de risco.

Praticamente todos os estudos tem associado os fatores de risco e protetores aos carcinomas do tipo endometrióide. São necessários estudos para avaliar quais os possíveis fatores de risco e proteção estão associados aos casos de carcinomas serosos, obviamente mais complexo devido à baixa frequência destes.

Os fatores de risco e de proteção para o carcinoma endometrial podem ser sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Fatores de Risco e Protetores para Carcinoma de Endométrio

<i>Fatores de Risco</i>	<i>Fatores de Proteção</i>
Estrógeno exógeno	Progestágenos
Anovulação	Anticoncepcional
Nuliparidade	Tabagismo
Tumor estrógeno-produtor	β-carotenos
Menarca precoce	Vitamina C
Menopausa tardia	
Obesidade	
Hirsutismo	
Tamoxifen	
Hipertensão	
Diabetes	
Dieta hiperlipídica	
História familiar	

Mark E. Sherman, Mod Pathol 2000;13(3):295-308, modificado.

3.4 CARCINOGENESE GENITAL ASSOCIADA AO HPV

3.4.1 ETIOLOGIA

A etiologia do câncer do colo uterino tem sido estudada há mais de 150 anos. Mais recentemente, com o advento da biologia molecular, ficou definido que este tumor é, em parte, sexualmente transmissível e causado por um agente infeccioso, o Papilomavirus humano ou HPV (*Human Papilloma Virus*) (Zur Hausen, 1982; Herrington, 1994; Walboomers e cols, 1999). Este vírus está presente em mais de 99,7% dos casos de carcinoma escamoso do colo uterino e possivelmente os 0,3% restantes estejam associados a HPVs ainda desconhecidos (Mougin e cols, 2001; Adams e cols, 2001).

O HPV é um vírus da família *Papovaviridae*, de DNA circular em dupla fita, composto por aproximadamente 8.000 pares de bases (Pfister, 1987; Melton e Rasmussen, 1991; Park e cols, 1995). São vírus cosmopolitas e infectam tanto humanos como animais (bovinos, cães, coelhos, macacos, ratos, alces e veados, entre outros). Apesar dos HPVs humanos e animais apresentarem estrutura genômica semelhante, eles são altamente espécies-específicos não ocorrendo infecção cruzada entre as espécies (Park e cols, 1995). Uma vez que as proteínas do capsídeo viral são antigenicamente similares, os HPVs não são classificados em sorotipos baseados nas características antigênicas estruturais, mas sim, em genotipos e subtipos, baseados em suas características de DNA. Para ser classificado como um tipo distinto, o vírus identificado necessita ter menos de 50% de homologia com o genoma de outro HPV conhecido (Park e cols, 1995).

Atualmente, mais de 150 tipos de HPVs humanos já foram identificados (Bernard, 2001), sendo que 40 acometem a mucosa genital e são transmitidos sexualmente. Estes vírus estão associados às lesões benignas (condiloma plano, acuminado) e malignas (carcinoma anogenital) (Pfister, 1987; Duggan e cols, 1993). A prevalência do HPV nos carcinomas anogenitais foi recentemente avaliada por Carter e cols (2001) e pode ser vista na tabela 8.

Tabela 8: Prevalência do DNA HPV nos carcinomas anogenitais (%)

Câncer	(n)	HPV (+)	HPV 16	HPV 18	HPV 30s^a	Múltiplos^b	Outros^c
CCEC^d	149	89,3	64,4	18,1	6,7	8,0	8,0
ACC^e	132	81,8	40,9	44,7	1,5	12,1	8,3
VULVA	219	89,0	71,2	5,9	9,6	5,0	7,3
Is^f	181	91,2	74,6	6,6	8,8	6,1	7,2
Inv^g	38	79,0	55,3	2,6	13,2	0,0	7,9
VAGINA	54	90,7	63,0	5,6	3,7	9,3	27,8
ANAL^h	64	93,8	79,7	9,4	6,2	10,9	10,8
Fem	45	95,6	82,2	11,1	6,7	11,1	8,9
Mas	38	94,7	76,3	5,3	7,9	7,9	13,2
PÊNIS	33	81,8	69,7	3,0	6,0	9,1	12,1

Carter e cols. Cancer Res 2001; 61:1934-40.

^a Inclui HPV 31, 33, 35 e 39.

^b Contém mais de um tipo de HPV.

^c Inclui HPV 6, 45, 52, 54, 58, 66, 72, 73 e HPV desconhecido.

^d CCEC: carcinoma de colo espino-celular

^e ACC: adenocarcinoma de colo ("in situ" e invasivo)

^f Is: "in situ"

^g Inv: invasor

^h Fem: feminino / Masc: masculino

3.4.2 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que metade das mulheres sexualmente ativas venham apresentar pelo menos um episódio de infecção HPV num período de 10 anos (Syrjänen & Syrjänen, 1990). Os mesmos autores prevêem que cerca de 79% das mulheres irão contrair a infecção HPV dos 20 aos 79 anos. Espera-se que 15% dos casos de infecção progridam, estando portanto, sob risco de câncer, 11% das mulheres (isto é, $0,79 \times 0,15 = 11\%$).

A idade de maior prevalência da infecção HPV é dos 20-25 anos, período de maior vulnerabilidade da zona de transformação, declinando a prevalência progressivamente com a idade (de Villiers e cols, 1987).

As lesões intraepiteliais de alto grau (NIC 2 e 3) e as lesões escamosas e glandulares invasivas malignas estão associadas a um grupo específico de HPVs denominados de Alto Risco Oncogênico, que são representados principalmente pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 61, 68, 73 e 82 (Villa, 1997; Kaufman e cols, 1997; Pillai & Nair, 2000; Snyder, 2003; Muñoz e cols, 2003). Conforme alguns autores, os vírus mais freqüentes são os 16 e 18, associados a 50% e 14%, respectivamente, dos casos de carcinoma do colo uterino (Howley, 1991; Bosch e cols, 1995; Koutsky e cols, 2002). Outros, entretanto, tem demonstrado a presença do HPV 16 em 80-90% dos carcinomas de células escamosas, enquanto que o 18 em somente 1-25% (Lorincz e cols, 1992; Hording e cols, 1992; Iwasawa e cols, 1996). Apesar de inicialmente também serem associados às lesões pré-invasivas e invasivas do colo uterino, os HPV 6 e 11, considerados os vírus não oncogênicos, estão mais freqüentemente associados com as verrugas genitais (condilomas) e lesões intraepiteliais de baixo grau (NIC 1) (Werness e cols, 1990; Hording e cols, 1997).

Em nosso meio, Noronha e cols, 1999 encontraram mais freqüentemente o HPV 16 nos casos de carcinoma (60,4%) e lesão intraepitelial de alto grau (54,5%).

Hording e cols, 1992, estudando 50 casos de adenocarcinomas e 50 de carcinomas escamosos do colo uterino observaram que o HPV 16 foi mais freqüentemente detectado nos carcinomas escamosos (60%) do que nos adenocarcinomas (18%). Em contrapartida, o HPV 18 foi encontrado mais freqüentemente nos adenocarcinomas (52%) que carcinomas escamosos (12%). Estas diferenças podem refletir que existem diferentes receptores virais nas células cervicais com diferentes potenciais morfológicos ou que um tipo específico de HPV cause uma doença específica.

O HPV 18 parece ser mais agressivo e estar associado a evolução mais rápida dos carcinomas. Comparado com os tumores contendo HPV 16, a idade média das mulheres com carcinoma associado ao HPV 18 é 8 a 12 anos mais jovens e as taxas de recorrência são maiores (45% versus 16%) (Walker e cols, 1989). Muñoz e cols, 2003, referem riscos diferentes para o carcinoma cervical para os diferentes tipos virais, sendo o HPV 16 o de maior risco com um OR=435, seguido pelo HPV 59 (OR=419), menos freqüente em nosso meio (Ver tabela 9).

Apesar da alta freqüência da infecção, a prevalência das lesões intraepiteliais e câncer do colo, comparativamente, é baixa. A história natural da infecção HPV demonstra que a maioria das infecções são transientes (80%) e não associadas com anormalidades citológicas detectáveis (Deacon e cols, 2000). Cerca de 5-10% das mulheres infectadas pelo HPV, mas inicialmente com citologia normal, desenvolverão uma NIC 3 com o passar dos anos (Deacon e cols, 2000). As razões para isto são ainda pouco compreendidas, mas tem-se observado a necessidade de outros fatores (cofatores) para o desenvolvimento desta neoplasia (Ursic-Vrascaj e cols, 1996; Daling e cols, 1996). Em adição a atividade sexual, outros fatores identificados como importantes são a multiparidade, infecções genitais crônicas, alterações hormonais e imunológicas, outras doenças de transmissão sexual, anticoncepcionais e o tabagismo (Deacon e cols, 2000).

Mulheres infectadas com um HPV de alto risco com colpocitologia oncótica normal, apresentam um risco de 116 vezes de desenvolver uma NIC 3, comparadas com mulher HPV (-) e citologia normal (Rozendaal e cols, 1996).

A maioria das mulheres infectadas pelo HPV desenvolvem anticorpos tipo-específicos, que persistem por muitos anos (Carter & Galloway, 1997). Os anticorpos anti-capsídeo viral são indicadores imperfeitos do tempo de exposição ao HPV, uma vez que anticorpos anti-capsídeo séricos ao HPV 16 são indetectáveis em 20-40% das mulheres que são DNA HPV (+) nas células da mucosa cervical (Carter & Galloway, 1997; Carter e cols, 2001).

Tabela 9: Risco Relativo estimado (Odds Ratio) ajustados para a detecção de DNA HPV e câncer de colo uterino

<i>Tipo HPV</i>	<i>OR</i>	<i>95% IC</i>
Qualquer	173	122,2-243,7
HPV 16	435	
HPV 18	248	
HPV 31	124	
HPV 33	374	
HPV 35	74	
HPV 45	198	
HPV 51	67	
HPV 52	200	
HPV 58	115	
HPV 59	419	

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S. N Engl J Med 2003;348:518-27.

3.4.3 COFATORES

O HPV isoladamente é incapaz de induzir ao câncer. Os fatores de risco não-virais mais importantes relacionados com o desenvolvimento de lesão pré-neoplásica e a progressão para o câncer invasivo são aqueles que afetam a imunidade do hospedeiro. Diversos cofatores foram identificados que podem alterar a habilidade do hospedeiro de responder, promovendo um estado crônico de carreador, transformação celular ou ambos (Cox, 1995). Os cofatores mais importantes são a alteração imunológica, desordem hormonal, tabagismo, infecções genitais concomitantes e fatores dietéticos.

3.4.3.1 TABAGISMO

Existe uma correlação muito grande entre o hábito de fumar e o câncer cervical, como observados em estudos na última década (Winkelstein, 1990). Mulheres fumantes apresentam um risco de 2,5-4 vezes maior de lesões pré-cancerosas e câncer do que as não-fumantes (Simons e cols, 1993; Deacon e cols, 1999). Schiffman e cols, 1993 e Ursic-Vrscaj e cols, 1996, porém, não encontraram um aumento de risco para o câncer cervical com o tabagismo. Eluf-Neto e cols, 1994, avaliando mulheres brasileiras também não encontraram associação do tabagismo e neoplasia cervical.

Daling e cols, 1996, avaliando 314 casos de câncer cervical e 672 controles observaram que mulheres fumantes apresentam um OR=2,5 (95% IC 1,8-3,4). Avaliando mulheres que nunca fumaram, mas cujos parceiros eram fumantes nos últimos 10 anos apresentaram um risco discreto, não significativo, de câncer cervical (OR=1,6 95% IC 0,9-2,7).

Os tumores glandulares não parecem ser afetados pelos efeitos do tabagismo, pois não tem se relatado nenhum risco aumentado para o adenocarcinoma (Cox, 1995).

O Programa Multicêntrico de Estudo do Câncer de Colo Uterino da IARC (International Agency for Research on Cancer) reviu a evidência do fumo e câncer cervical e concluiu que fumar é um fator de risco independente para o câncer cervical. Qualquer quantidade de fumo foi associado com aumento dobrado, estatisticamente significativo, do risco de câncer cervical e, com dose-resposta (Moreno e cols, 2002).

Examinando o muco cervical de fumantes, observou-se que a cérvix pode ser exposta a carcinógenos conhecidos encontrados no tabaco como a nicotina, cotinina, fenóis, hidrocarbonetos e alcatrão (Schiffman e cols, 1987). Há cinco principais mecanismos que explicam a associação entre o tabagismo e o câncer de colo uterino: 1) metabólitos carcinogênicos do fumo absorvidos e transportados via hemática para o colo, eliminados pela secreção cervical; 2) supressão do sistema imunológico e imunoglobulinas séricas, diminuindo o nível de anticorpos circulantes (Schiffman e cols, 1987); 3) mutação do gen p53 por ação do benzopireno na célula (Park e cols, 1994); 4) inibição da apoptose celular pela nicotina, levando ao crescimento tumoral (Daling, 1996; Eppel e cols, 2000); 5) diminuição significativa da densidade e função das células de Langerhans, células possuidoras de antígeno, que são importantes na imunidade celular local (Barton e cols, 1988). Esta diminuição das células de Langerhans foi observada tanto no epitélio cervical normal quanto nas lesões intraepiteliais e está nitidamente relacionado com a dose.

Portanto, o efeito mais importante do fumo parece ser o prejuízo na capacidade da imunidade celular local em suprimir permanentemente ou eliminar o HPV. A falência da imunovigilância pode permitir a persistência a longo prazo do vírus, necessária para a maior parte da oncogênese pelo HPV com maior exposição do epitélio metaplásico imaturo normal a este vírus (Cox, 1995).

Outra rota de contato dos metabólitos do fumo com o colo uterino é através do parceiro sexual tabagista. A quantidade de cotinina encontrada no muco cervical é similar a do sêmen (Sasson e cols, 1985). Jones e cols, 1991 também encontraram nível elevado de nicotina no muco cervical de mulheres que não fumavam mas eram expostas em ambientes de fumantes.

3.4.3.2 ANTICONCEPCIONAIS HORMONAIS

Um risco aumentado de câncer cervical e seus precursores em mulheres usuárias de anticoncepcionais orais (ACO) foi descrito por alguns autores e refutado por outros (Brinton e cols, 1990; Deacon e cols, 1999; Ylitalo e cols, 1999).

Fatores epidemiológicos podem confundir esta associação. Mulheres que usam contraceptivos orais geralmente são examinadas mais freqüentemente, aumentando a probabilidade de detecção de lesões cervicais pré-invasivas. Adicionalmente, estas mulheres menos provavelmente utilizam métodos contraceptivos de barreira, aumentando o risco de exposição aos agentes sexualmente transmissíveis (Cox, 1995).

Deacon e cols, 1999, avaliando as mulheres HPV positivas e negativas, não observaram associação significativa entre os anticoncepcionais orais e a infecção HPV ou neoplasia intraepitelial cervical grau acentuada (NIC 3).

No mesmo ano, porém, Ylitalo e cols encontraram uma associação significativa entre os ACO e NIC 3, com um risco aumentado de 4 vezes. Estes resultados são

praticamente os mesmos encontrados por Negrini e cols, 1990, que avaliando 1994 mulheres encontraram risco de 4,6 vezes para lesão intraepitelial de alto grau e o uso de ACO por mais de 5 anos. Neste mesmo ano, Becker e cols não encontraram risco, pelo contrário, observaram um efeito protetor dos ACO em relação às lesões intraepiteliais e mesmo nos carcinomas invasores e justificam o fato pelo uso exclusivo de ACO de baixa dosagem.

Brinton e cols, 1990 avaliaram o efeito dos contraceptivos orais nas mulheres Latino-Americanas e encontraram um risco associado apenas para as mulheres que iniciaram o uso de ACO antes dos 20 anos (RR=1,5 95% IC 0,8-2,6) ou acima dos 29 anos (RR=1,6 95% IC 1,1-2,4).

Daling e cols, 1996, observaram risco maior de câncer cervical quando o início do uso foi em mulheres ≤ 17 anos, co RR=2,3 (95% IC 1,4-3,8).

Moreno e cols, 2002, demonstraram através do Programa Multicêntrico de Estudo do Câncer de Colo Uterino da IARC que o uso de contraceptivos hormonais orais por menos de 5 anos não foi relacionado ao câncer cervical (OR=0,77 95% IC 0,46-1,29) mas, o risco aumentou significativamente com 5 a 9 anos de uso (OR=2,72 95% IC 1,36-5,46) e por mais que 10 anos (OR=4,48 95% IC 2,24-9,36).

O mecanismo pelo qual os ACO estariam associados ao carcinoma cervical seria o aumento da chance de ter ectopia, que predispõe a algumas infecções principalmente pela Chlamydia, que mostrou ser um cofator importante no câncer cervical nos últimos anos (Koskela e cols, 2000; Zenilman, 2001; Anttila e cols, 2001). Também mostrou-se que os ACO diminuem o ácido fólico sanguíneo, causando alterações megaloblásticas nas células epiteliais cervicais (Whitehead e cols, 1992). Alternativamente, algumas evidências mostram que os ACO podem aumentar o efeito do HPV pela presença de receptor hormonal na região regulatória da transcrição do DNA do HPV, induzindo a expressão das oncoproteínas virais (Mittal e cols, 1993).

Herrero e cols, 1990 avaliando mulheres usuárias de anticoncepcionais injetáveis (ACI), observaram aumento de risco apenas para as usuárias por período de 5-10 anos (RR=2,4) e para as usuárias por mais de 10 anos (RR=3,4).

3.4.3.3 PARIDADE

A incidência aumentada de câncer cervical, em associação com uma paridade aumentada foi considerada como um reflexo da atividade sexual e idade de início do coito. Este aumento da suscetibilidade também poderia estar associado ao estado nutricional alterado durante a gestação (principalmente a deficiência de folatos), efeito dos hormônios no colo uterino causando eversão, trauma do parto sobre o epitélio cervical e maior expressão do HPV (Whitehead e cols, 1992; Mittal e cols, 1993; Cox, 1995).

Whitehead e cols, 1992 demonstraram que fatores nutricionais durante a gravidez também podem estar relacionados com a suscetibilidade do epitélio cervical, já que a gravidez depleta as reservas maternas de ácido fólico.

A eversão do epitélio colunar durante a gravidez ou as lacerações cervicais no parto resultariam em um processo regenerativo por metaplasia escamosa imatura, cujas células são mais permissivas ao HPV, aumentando o risco de transformação celular. Por outro lado, a progesterona induz a uma instabilidade dos oncogenes do HPV, podendo facilitar a

integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, promovendo a progressão para a malignidade (Mittal e cols, 1993).

De Britton e cols, 1993 observaram que o número de gravidezes era um fator prognóstico adverso, porque mulheres com 6 ou mais partos tinham um risco 2,5 vezes maior de morrer de câncer cervical comparadas com mulheres com 3 ou menos partos.

Moreno e cols, 2002, através do Programa Multicêntrico de Estudo do Câncer de Colo Uterino da IARC encontraram que as mulheres HPV (+) que relataram sete ou mais gestações a termo tiveram um risco 4 vezes maior para o câncer cervical quando comparadas às mulheres nulíparas (OR=3,8 95% IC 2,7-5,5).

3.4.3.4 DIETA

Fatores dietéticos podem exercer um papel importante tanto pelo seu efeito antioxidante como por sua ação sobre a imunidade celular local. Entretanto, nem todos os estudos encontraram uma relação entre a dieta e o risco de carcinoma cervical.

Verrault e cols, 1989 e Slaterry e cols, 1990, em estudos caso-controles, mostraram um risco diminuído de câncer cervical com uma elevada ingestão de vitaminas A, C e E e betacarotenos.

Uma ingestão aumentada de vitamina C esteve associada a uma redução de 60% no risco de câncer cervical (Brock e cols, 1988) e níveis elevados de ácido ascórbico no plasma persistiram como um fator protetor independente, mesmo após ajuste para o HPV (Basu e cols, 1991).

Brock e cols, 1988 observaram que mulheres que apresentaram maior ingestão de betacaroteno mostraram ter metade do risco de carcinoma “in situ” do que aquelas que relataram menor ingestão. A ingestão de betacaroteno por suplementação vitamínica parece ser marginalmente protetora, mas uma ingestão aumentada de vegetais verdes e cenoura, as duas principais fontes de betacaroteno, mostrou estar associada a um risco significativamente menor de carcinoma cervical, indicando que um componente não identificado das dietas ricas em vegetais também pode ser importante na prevenção do câncer (Palan e cols, 1991).

3.4.3.5 OUTRAS INFECÇÕES

Estudos epidemiológicos iniciais da neoplasia cervical implicaram no passado vários agentes infecciosos tais como *Trichomonas*, Vírus herpes simples (HSV) tipo 2, *Treponema pallidum*, entre outros, como agentes etiológicos do câncer de colo uterino. A incidência aumentada destes agentes em mulheres com carcinoma cervical provavelmente está relacionada apenas à atividade sexual (Cox, 1995).

Alguns agentes de transmissão sexual como o HSV e *Chlamydia trachomatis*, no entanto, permanecem como possíveis cofatores no desenvolvimento das neoplasias cervicais. Um sinergismo entre a infecção pelo HSV e HPV talvez possa intensificar o desenvolvimento de pelo menos alguns carcinomas cervicais (zur Hausen, 1982). Se o HSV tem um papel na carcinogênese cervical, pode ser na interação com os ceratinócitos cervicais e na indução de mutações, predispondo assim às alterações neoplásicas, sem

manutenção do seu DNA dentro do genoma da célula hospedeira modificada (Galloway & McDougall, 1983).

Allderling e cols, 1985 observaram uma velocidade maior de progressão das NIC 3 em mulheres com alterações citológicas sugestivas de Chlamydia nos esfregaços cervicais. Se a Chlamydia tiver qualquer efeito na promoção da carcinogênese cervical, isto pode ser secundário aos seus efeitos na redução da imunidade epitelial, que pode ocorrer na metaplasia reparadora, induzida na cervicite aguda ou crônica, consistente com a associação de outros carcinomas na região anogenital e com a inflamação crônica (Cox, 1995). Fan e cols, 1998 demonstraram que a Chlamydia inibe a apoptose das células infectadas, sugerindo que esta bactéria pode produzir fatores que interrompem o mecanismo de apoptose celular podendo interferir na via carcinogênica cervical.

A exposição à Chlamydia trachomatis, avaliada sorologicamente, foi relatada como um fator de risco significativo e independente para a neoplasia cervical (Koskela e cols, 2000; Zenilman, 2001; Antilla e cols, 2001). Koskela e cols, 2000 avaliaram 530.000 soros para anticorpos IgG anti Chlamydia trachomatis comparados com 182 casos de carcinoma de colo e observaram um OR= 2,2 (95% IC 1,3-3,5) para os casos Chlamydia (+). Antilla e cols, 2001 observaram que o sorotipo G da Chlamydia trachomatis parece estar fortemente associada com o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas do colo uterino, com um OR= 6,6 (95% IC 1,6-27,0).

Outro agente microbiano associado às lesões do colo uterino é o Mycoplasma hominis. Carvalho e cols, 1997 demonstraram uma maior prevalência da infecção por esta bactéria nas mulheres portadoras de lesões intraepiteliais cervicais, comparadas com um grupo controle.

3.4.3.6 IMUNOSSUPRESSÃO

Estudos com pessoas com imunodeficiência celular congênita ou adquirida confirmam a importância da imunidade na supressão do HPV e das neoplasias induzidas pelo HPV (Cox, 1995). A imunossupressão provavelmente aumenta o risco de transformação celular, permitindo que o vírus escape à imunovigilância, permitindo assim a persistência viral por longo tempo (zur Hausen, 1986). Estimativas do tempo médio entre a aquisição da infecção HPV e o desenvolvimento do tumor maligno são de 5 a 25 anos para o câncer cervical e acima de 50 anos para o câncer vulvar (zur Hausen, 1986).

Pacientes com transplante renal, usuários de imunossupressores, apresentam uma incidência 16 vezes maior de NIC, verrugas genitais e neoplasia anal, como observado por Halpert e cols, 1986.

A prevalência da infecção cervical pelo HPV varia de 2-4 vezes maior nas mulheres HIV (+), comparadas às HIV (-) (Cox, 1995).

Mulheres infectadas pelo HIV são aproximadamente 5 vezes mais propensas a desenvolver lesões escamosas intraepiteliais cervicais que as HIV (-) (Wright e cols, 1994).

O câncer cervical invasivo é encontrado cerca de 3 vezes mais frequentemente em mulheres infectadas pelo HIV. Nos Estados Unidos, jovens negras e hispânicas infectadas pelo HIV podem ter um risco 4-7 vezes maior de desenvolver o carcinoma cervical invasivo (Ellerbrock e cols, 2000).

3.4.4 PATOGÊNESE

O ciclo de vida do HPV está intimamente associado com o processo de diferenciação da célula epitelial hospedeira. O HPV infecta o epitélio cervical por meio de defeitos na mucosa escamosa, afetando diretamente as células basais. Os receptores provavelmente associados à entrada do vírus na célula incluem as integrinas α -6 e β -4, que se encontram aderidas à matriz extra-celular. Estas integrinas são reguladas durante o processo de cicatrização e podem facilitar a entrada dos vírus nas células por meio da endocitose. Nas células, a expressão viral é firmemente controlada e a replicação inicia-se em função da maturação epitelial. Este processo está associado à expressão de gens estruturais tardios e a produção de capsídeos virais e/ou proteínas tardias (L1 e L2), na superfície epitelial (Howley, 1991). A zona de transformação do colo uterino apresenta um alto nível de conversão do estradiol em 16 α -hidroxiestrone e quando estas células são imortalizadas pelo HPV de alto risco, esta atividade aumenta em cerca de 8 vezes. É sabido que os esteróides sexuais (estrógeno e progesterona) aumentam a apoptose celular e que a estrone é funcionalmente menos eficiente que o estradiol (Webster e cols, 2001).

3.4.4.1 GENOMA VIRAL

As unidades E1 e E2 do HPV impedem a expressão de seqüências críticas para a transformação neoplásica nas células em replicação. E2 é uma proteína ligadora de DNA que tem um papel indireto na transformação, por meio da regulação da transcrição do promotor de E6 e E7 dos HPV 16 e 18 (Bernard e cols, 1989; Romanczuk e cols, 1990; Webster e cols, 2001). Deste modo, a integração e a perda da função de E2 resultam na produção excessiva das proteínas E6 e E7 (Park e cols, 1995). Em algum momento na patogênese do câncer, geralmente no ponto de transição entre a doença intraepitelial e a invasiva, o vírus é ligado ao DNA da célula hospedeira. A integração do genoma viral ao DNA da célula carcinomatosa hospedeira ocorre sempre entre E1 e E2, resultando na perda ou alteração de E2, enquanto outras regiões do genoma viral permanecem intactas (Schwarz e cols, 1985; Baker e cols, 1987; Park e cols, 1995; Kitagawa e cols, 1996).

3.4.4.2 ONCOPROTEÍNA E6 / PROTEÍNA p53

A proteína E6 parece alterar o crescimento celular através do seu efeito em p53, que é uma proteína supressora tumoral endógena. O p53 é uma fosfo-proteína nuclear que regula negativamente o crescimento e a divisão celular (Park e cols, 1994). O aumento transiente do p53 é observado em resposta ao dano do DNA e o acúmulo desta proteína induz a parada do crescimento celular na fase G₁ do ciclo celular. Presume-se que esta parada tem por objetivo o reparo do dano do DNA para manter a integridade genômica antes da progressão para a fase S e a síntese do DNA (Whang & Lee, 1997).

A inativação de p53 pode ocorrer tanto pela ligação com E6 como pela mutação (Park e cols, 1994; Skyldberg e cols, 1999). As proteínas E6 produzidas pelos gens E6 HPV de alto risco se ligam e degradam o p53, através do sistema proteolítico ubiquitina-dependente, desaparecendo a ação antitumoral do p53 (Hollstein e cols, 1991; Pillai & Nair,

2000; Webster e cols, 2001). O gen supressor tumoral p53 é o gen mais frequentemente mutado em um amplo espectro de câncer humano (Whang & Lee, 1997). Esta mutação é frequentemente detectada no carcinoma endometrial e ovariano, mas é pouco frequente no câncer cervical (Tenti e cols, 1998; Skyldberg e cols, 1999).

Vários pesquisadores tem estudado a questão da mutação de p53 na neoplasia cervical, apresentando uma prevalência que varia de 7 a 13% (Greenblatt e cols, 1994).

Crook e cols, 1992, hipotetizaram que todos os casos de câncer cervical HPV (-) apresentavam mutação de p53. Resultados de outros trabalhos, porém, demonstraram que o mecanismo oncogênico envolvido nestes tumores não estão ainda completamente definidos. Park e cols, 1994 observaram uma mutação de p53 mais freqüente nos carcinomas HPV-negativos, em cerca de 10%. Jiko e cols, 1994, também encontraram um percentual maior de mutação de p53 (32%) nos casos HPV (-). Tenti e cols, 1998, entretanto, encontraram uma maior prevalência de mutação de p53 nos casos de adenocarcinomas HPV (+) (16%) que HPV (-) (5,5%).

Milde-Langosh e cols, 1995 encontraram uma freqüência praticamente igual de mutação p53 tanto nos adenocarcinomas (7,7%) como carcinomas escamosos (8%).

Uma avaliação de vários pesquisadores pode ser vista na tabela 10, onde observamos que a mutação de p53 é identificada em uma média de 6,7% dos casos de carcinomas cervicais HPV-positivos e 27% nos tumores HPV-negativos.

Tabela 10: Freqüência (%) da mutação de p53 nos carcinoma cervicais

<i>Autor</i>	<i>Ano</i>	<i>HPV (+)</i>	<i>HPV (-)</i>
Borresen e cols	1991	2,2	0
Crook e cols	1992	0	100
Busby-Easle e cols	1992	0	0
Fujita e cols	1992	6,8	0
Tsuda e cols	1992	3,3	12,5
Crook e cols ⁽²⁾	1992	28,5	100
Park e cols	1994	2,3	9,5
Jiko e cols	1994	9,1	50
Milde-Langosch e cols	1995	4,8	20
Kim e cols	1997	1,5	0
Tenti e cols	1998	16,1	5,5
Total		6,7	27

Tenti e cols. Am J Pathol 1998, modificado.

Tenti e cols, 1998 encontraram mutação somática de p53 em 13,5% dos casos, sendo a maioria pouco diferenciados, volumosos e em estágios avançados, como descrito por Sherman e cols, 1995, para os casos de adenocarcinoma endometrial. A mutação mais freqüentemente encontrada na série de Tenti e cols foi G:C para A:T, responsável por aproximadamente 50% das mutações de p53 em vários tumores. Esta mutação também é a mais freqüente no carcinoma endometrial (Greenblatt e cols, 1994), mostrando outra

similaridade entre os dois tumores. Resultado semelhante foi encontrado por Hollstein e cols em 1991 onde cerca de 47% dos tumores cervicais que apresentavam mutação de p53 apresentavam uma substituição de G:C para A:T

A mutação de p53 pode ocorrer em vários códons (Tabela 11). Aproximadamente 32% de todos os tumores com mutação de p53 ocorrem no dinucleotídeo C:G, localizado nos códons 175, 196, 213, 248, 273 ou 282 (Park e cols, 1994).

Park e cols, 1994, mostraram que 50% dos casos de câncer cervical HPV (-) tinham mutação de p53 nos códons 181, 240, 245 e 249. Estas mutações tem sido associadas à exposição ao benzopireno, mutágeno encontrado no cigarro.

Um polimorfismo comum que ocorre na sequência de aminoácidos resulta na presença ou da prolina ou da arginina na posição (códon) 72. O efeito deste polimorfismo na suscetibilidade da degradação do p53 pelo E6 foi estudado por Storey e cols em 1998. Os autores demonstraram que a arginina no códon 72 torna o p53 mais suscetível à degradação do que a prolina. Indivíduos homozigotos para a arginina nesta posição são cerca de 7 vezes mais suscetíveis à carcinogênese pelo HPV que os heterozigotos.

Tabela 11: Localização da mutação p53 no carcinoma cervical

<i>Autor/Ano</i>	<i>HPV</i>	<i>Mutação</i>	<i>Códon</i>
Crook e cols, 1991	(-)	CGT→TGT	273
		GGC→GTC	245
Crook e cols, 1992	(-)	CGT→TGT	273
		AGG→AGT	249
		AGT→ATT	240
Crook & Vousden, 1992	(-) (+)	CGC→CTC	181
		CGC→CCC	175
		GTG→TTG	173
Fujita e cols, 1992	(+)	ATG→CTG	133
		CGG→TGG	248
Borresen e cols, 1992	(+)	GTG→GTA	173
		CTG→TGT	265
Paquette e cols, 1993	(-) (+)	GTG→ATG	143
		CGC→CAG	248
Park e cols, 1994	(-)	CGT→CAT	273

Park DJ, Wilczynski SP, Paquette RL, et al. Oncogene 1994;9:205-10, modificado.

3.4.4.3 ONCOPROTEÍNA E7/PROTEÍNA pRb

O gen E7, isoladamente, é capaz de causar immortalização celular (Halbert e cols, 1991). A eficiência desta oncoproteína viral em ligar-se ao pRb e outras proteínas relacionadas, como p107 e p130 reflete na capacidade do HPV immortalizar ou transformar as células (Heck e cols, 1992; Parker e cols, 1995; Steenbergen e cols, 2001).

Nas células normais não infectadas pelo HPV de alto risco, a forma hipofosforilada da proteína pRb, p107 e p130, formam complexos inibitórios com fatores de transcrição da família E2F, inibindo o crescimento celular. Para isso há inibição de proteínas necessárias para a síntese de DNA, tais como a timidino-cinase, dehidrofolato redutase, DNA polimerase α e os proto-oncogenes *c-myc* e *N-myc* (Parker e cols, 1995).

A afinidade de E7 e pRb difere de acordo com o tipo de vírus envolvido. As proteínas E7 dos vírus de baixo risco 6 e 11 apresentam uma afinidade para pRb 20 e 5 vezes menor que os vírus de alto risco 16 e 18, respectivamente, daí a incapacidade de immortalizar os ceratinócitos de forma adequada (Werness e cols, 1990; Schefner e cols, 1991; Howley, 1991).

As proteínas E7 dos HPV de alto risco alteram este mecanismo de controle do crescimento celular, ativando os fatores de transcrição E2F e consequentemente estimulando a replicação do DNA (Parker e cols, 1995).

3.4.4.4 TELOMERASE

A telomerase é uma enzima associada à inibição da apoptose celular. Os genes E_6 dos HPVs de alto risco, principalmente HPV 16, estimulam a expressão desta enzima, diminuindo a apoptose celular, facilitando o processo de carcinogênese (Pillai & Nair, 2000). O aumento da atividade da telomerase é consequência da perda de alelos do cromossomo 6 nos ceratinócitos immortalizados pelos HPV de alto risco (Steenbergen e cols, 2001).

3.4.4.5 ALTERAÇÃO CROMOSSÔMICA

O desenvolvimento de um tumor maligno, independente do sítio anatômico, é um processo progressivo que envolve a aquisição e acúmulo de várias alterações genéticas. Análise citogenética e molecular tem identificado regiões específicas cromossômicas e gens envolvidos neste processo (Parker e cols, 1995).

Estudos citogenéticos realizados em carcinomas cervicais invasivos tem identificado alterações estruturais e numéricas em diferentes cromossomos (Atkin & Baker, 1979; Sreekantaiah e cols, 1988). As alterações no cromossomo 1 tem sido a mais freqüentemente observada, mas ocasionalmente, os cromossomos 4, 5, 6, 11, 13, 17, 18, e 21 tem estado também envolvidos (Atkin & Baker, 1979). Em uma análise citogenética de 148 carcinomas cervicais invasivos, Sreekantaiah e cols, 1988, detectaram alterações cromossômicas em 95% dos casos. Alterações numéricas, principalmente a perda do cromossomo 1, foi observado em 54% dos casos. Outras alterações encontradas no cromossomo 1 incluíram deleções, isocromossomos e translocações. Neste mesmo estudo

também foram encontradas alterações no cromossomo 1 nos casos de carcinoma “in situ”, sugerindo que estas alterações podem ocorrer precocemente no desenvolvimento do câncer.

3.4.4.6 PERDA DA HETEROZIGOSIDADE

À partir da década de 90, estudos citogenéticos clássicos tem sido complementados pelo desenvolvimento de técnicas moleculares que utilizam a análise de alelotipos para detectar as alterações genéticas (Parker e cols, 1995). Uma das vantagens destes métodos é que eles tem ajudado a identificar regiões cromossômicas que abrigam gens supressores tumorais. Somente uma simples cópia de um gen supressor tumoral parece ser requerido para manutenção da função celular normal. Na maioria dos tumores em que ocorre a perda da função de um gen de supressão tumoral, por exemplo o Rb, a mutação de um alelo deste gen é acompanhada pela perda (deleção) do alelo não mutado (Hinds & Weinberg, 1994). É a combinação da mutação de um alelo recessivo do gen supressor tumoral com a deleção de outro, não mutado, que resulta em homozigossidade ou perda da heterozigossidade e a carcinogênese.

3.4.4.7 ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDADE HLA

A resposta imune celular é relevante para a defesa do hospedeiro sobre a progressão tumoral nos casos de carcinomas do colo uterino, como se observa a alta incidência de lesões intraepiteliais cervicais e carcinoma cervical em mulheres imunocomprometidas (Schafer e cols, 1991). De fato, a eficácia da imunidade celular depende fortemente da apresentação dos antígenos associados ao tumor pelas moléculas HLA (Ferrera e cols, 1999).

Os vários estágios da história natural do carcinoma cervical dependem da resposta imunológica do hospedeiro, associada ao adequado funcionamento dos gens HLA classe I e II. Wank & Thomssen, 1991 observaram um aumento no risco de desenvolvimento do carcinoma escamoso do colo uterino em mulheres alemãs com HLA-DQ3. Entretanto, esta associação não foi detectada em outras populações, mostrando a implicação de diferentes fatores étnicos e/ou ambientais como responsáveis por este risco maior (Ferrera e cols, 1999).

Ferrera e cols, 1999 estudando lesões intraepiteliais e carcinomas invasores de colo uterino observaram um predomínio de HLA-DQA1*0301 nas mulheres com casos avançados (RR=3,45; p=0,008), enquanto que o HLA-DQA1*0501 estava negativamente associado (RR=0,3; p=0,03), sugerindo um efeito protetor deste alelo.

3.4.4.8 ANGIOGÊNESE

A angiogênese ou neovascularização é um importante mecanismo para a sustentação da gênese tumoral nas neoplasias. As células malignas pré-invasivas permanecem dormentes até o momento em que se tornam angiogênicas. Esta mudança é seguida pela fase de rápido crescimento tumoral. O p53 é um fator importante na regulação da

angiogênese. A trombospondina-1 (TSP) é um importante inibidor da angiogênese (Pillai & Nair, 2000). O p53 é um ativador do gen da TSP. A diminuição do p53 leva a uma redução na expressão da TSP, reduzindo a inibição da angiogênese, cujo aumento também está associado a uma diminuição da apoptose celular, facilitando a progressão tumoral (Pillai & Nair, 2000).

3.4.5 ADENOCARCINOMA

Dados epidemiológicos e clínico-patológicos sugerem que o carcinoma cervical de células escamosas e o adenocarcinoma primário de colo podem diferir nos mecanismos etiopatogênicos (Brand e cols, 1988).

Representando cerca de 20-30% dos casos de carcinoma cervical (Parker e cols, 1997; O'Leary e cols, 1997; Riethdorf e cols, 2000), o adenocarcinoma apresenta fatores de risco semelhantes ao adenocarcinoma endometrial (Milson & Friberg, 1983; Tenti e cols, 1998) e sua incidência está aumentando nos últimos anos, especialmente em mulheres mais jovens (Riethdorf e cols, 2000). Milson & Friberg, 1983, comparando os casos de adenocarcinoma e carcinomas escamosos, encontraram um número significativamente maior de mulheres diabéticas e nulíparas nos casos de adenocarcinomas.

A mutação *K-ras*, infrequente no carcinoma escamoso, é freqüentemente detectado no adenocarcinoma, com freqüência semelhante ao adenocarcinoma endometrial. Tenti e cols, 1998 analisando 74 casos de adenocarcinomas primários de colo uterino observaram que a maioria das mutações foram a conversão de glicina ao ácido aspártico no códon 12, como freqüentemente é observado no carcinoma endometrial. Esta observação, em associação com outras similaridades genéticas, pode constituir uma evidência que o adenocarcinoma endometrial e cervical compartilham mesmas características etiológicas.

Há cerca de 10 anos o DNA HPV tem sido encontrado também nos casos de adenocarcinoma (Leminen e cols, 1993). A taxa de positividade do HPV no adenocarcinoma cervical varia de 15-85% (Duggan e cols, 1993; Yamakawa e cols, 1994; Hachisuga e cols, 1996; Uchiyama e cols, 1997; Anciaux e cols, 1997; Lee e cols, 1998; Ronnett e cols, 1999; Riethdorf e cols, 2000). A diferença da positividade encontrada pelos diversos autores provavelmente está associada à sensibilidade dos métodos utilizados para extração do DNA viral, diferentes metodologias, bem como as diferenças na preparação, fixação e processamento da amostra tecidual.

Nos casos de adenocarcinomas em que o HPV não é identificado, observa-se freqüentemente uma hiperexpressão de p53 mutado (Park e cols, 1993; Uchiyama e cols, 1997).

Vários trabalhos mostram que enquanto o HPV 16 é o mais freqüente nos casos escamosos, o HPV 18 é o mais prevalente nos adenocarcinomas (Wilezynski e cols, 1988; Okagaki e cols, 1989; Duggan e cols, 1993; Kitagawa e cols, 1996; Hording e cols, 1997). É possível que tipos específicos de HPV tenham tropismo por tipos diferentes de células (HPV 16 pelo epitélio escamoso e 18 pelo glandular), apresentando capacidade oncogênica distinta (Duggan e cols, 1993).

Tase e cols, 1989, estudando a presença do HPV pela técnica de Híbridização "in situ" nos casos de lesões glandulares menores e hiperplasia microglandular endocervical do colo uterino, encontraram que na maioria dos casos não havia associação nem com o HPV

16 nem com o 18, concluindo que as “displasias glandulares menores” não poderiam ser classificadas como precursoras do adenocarcinoma. Samaratunga e cols, 1993 utilizando também a técnica de Hibridização “in situ”, encontraram a associação do adenocarcinoma “in situ” (AIS) com HPV 16 e 18 em 43% dos casos, mas também nenhuma relação com as lesões glandulares menores. Estes dados suportam a idéia que muitas destas lesões glandulares menores, assim como as hiperplasias microglandulares endocervicais, representariam apenas alterações reacionais.

Pfister & Fuchs em 1991 demonstraram que o HPV 18 predominava nos adenocarcinomas e nos tumores adenoescamosos, enquanto o 16, nas lesões escamosas puras. Quando o tipo histológico é o mesmo, os causados pelo HPV 18 geralmente são mais agressivos que os causados pelos outros tipos (Nakagawa e cols, 1996).

Entretanto, outros estudos mostram que não há preferência do HPV 18 nos casos de adenocarcinomas e em alguns estudos há inclusive um predomínio do tipo 16 (ver tabela 12).

Utilizando técnicas de detecção do DNA HPV mais sensíveis, como o PCR, por exemplo, atualmente o AIS é considerado como o precursor do adenocarcinoma invasor (AI). O AIS e o AI, assim como as atipias glandulares maiores, estão freqüentemente associados com as lesões intraepiteliais escamosas, indicando a possibilidade de um fator etiológico comum (Anciaux e cols, 1997).

Arends e cols, 1990 demonstraram que 51% dos AIS e 23% dos AI apresentam uma associação com NIC 3, lesão freqüentemente associada ao HPV 16 e algumas vezes com o 18. Anciaux e cols, 1997 encontraram uma associação das lesões glandulares (AIS e AI) com lesões escamosas em 47,5% dos casos, sendo que mais de 90% foram lesões de alto grau ou invasoras. Os casos de AIS e AI não associados às lesões escamosas, apresentaram uma positividade para os HPV de alto risco de 75% e 50%, respectivamente, geralmente dos tipos 16 e 18.

Duggan e cols, 1993, avaliando 114 casos de adenocarcinoma endocervical pela técnica Dot blot de hibridização do DNA encontraram DNA HPV em 44% dos casos de AI e 27% dos AIS. O HPV 18 foi mais encontrado que o 16 nos AI (20% versus 5%) e AIS (29% versus 21%). Por outro lado, o HPV 16 foi mais encontrado que o 18 nos casos de carcinomas adenoescamosos (29% versus 18%). Este achado pode indicar novamente que tipos específicos de HPV apresentam predileção por tipos histológicos específicos de tumores cervicais.

Yamakawa e cols, 1994 e Duggan e cols, 1995, demonstraram a presença de HPV em cerca de 70% dos casos de adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos pela técnica de PCR combinada com Hibridização Dot blot. O HPV 16 predominou nos casos de carcinomas adenoescamosos enquanto o HPV 18 nos adenocarcinomas endocervicais, endometrióides, seroso papilíferos e subtipo de células intestinais (Duggan e cols, 1993; Nakagawa e cols, 1996; Lee e cols, 1998). Teshima e cols, 1997 avaliando casos de adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos pelos métodos de Southern blot e PCR, observaram que o HPV 18 foi o mais prevalente, aparecendo em 100% dos casos positivos para o HPV, mas encontraram também 25% de HPV desconhecidos nos casos de carcinomas adenoescamosos.

Tenti e cols, 1996 investigaram 138 casos de AI do colo uterino e observaram a presença do DNA HPV em 84,8% dos casos, sendo 28% positivos para HPV 16, 30% para o HPV 18 e 27% para ambos. As mulheres com infecção HPV eram significativamente mais jovens que a sem o HPV. Resultados semelhantes foram encontrados por Skyldberg e

cols, 1999 que avaliaram a presença do HPV no adenocarcinoma de colo uterino em duas populações distintas: Irlanda e Suécia. A positividade do HPV nas mulheres irlandesas foi de 84% enquanto que nas Suecas em apenas 37%. Talvez a diferença esteja associada à idade das mulheres, uma vez que a média de idade das mulheres irlandesas era de 43 anos enquanto que para as suecas de 61 anos.

Tabela 12: Frequência do DNA HPV 16 e 18 por Hibridização e PCR nos casos de adenocarcinoma cervical

<i>Autor/Ano</i>	<i>País</i>	<i>n</i>	<i>Técnica</i>	<i>HPV Positivo (%)</i>		
				<i>Total</i>	<i>16</i>	<i>18</i>
Leminen, 1991	Finlândia	106	His	18	02	14
Griffin, 1991	Inglaterra	16	HDb	31	25	06
Bjersing, 1991	Suécia	26	His	42	15	27
Johnson, 1992	EUA	22	PCR	82	23	59
Hording, 1992	Dinamarca	50	PCR	70	18	52
Duggan, 1993	Canadá	77	PCR	44	18	23
Das, 1993	Índia	12	PCR	58	42	17
Lee, 1993	EUA	20	PCR	15	10	08
Chen, 1994	Taiwan	42	PCR	67	19	48
Yamakawa, 1994	Japão	43	PCR	56	21	33
Tenti, 1996	Itália	138	PCR	85	28	30
Iwasawa, 1996	Finlândia	108	PCR	75	17	56
Parker, 1997	EUA	32	PCR	50	22	28
Uchiyama, 1997	Japão	32	PCR	34	19	12
Ferguson, 1998	EUA	27	PCR	59	26	26
Tenti, 1998	Itália	74	PCR	76	20	33
Lee, 1998	Taiwan	69	PCR	32	16	14
Skyldberg, 1999	Irlanda/Suécia	38	PCR	61	24	26
Total		932		57	22	28

Obs: His: Hibridização "in situ", HDb: Hibridização Dot blot, PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Lee M F, Chang M C, Wu C H. Int J Gynaecol Obstet 1998; 63(3):265-70, modificado.

Utilizando a técnica de PCR para identificação do HPV, trabalhos mais recentes demonstram que 70-90% dos adenocarcinomas cervicais estão infectados pelos HPV de alto risco (Iwasawa e cols, 1996; Tenti e cols, 1996; Riethdorf e cols, 2000).

Riethdorf e cols, 2000 observaram uma positividade de HPV 16 e/ou 18 em 88% dos AIS e em 85% dos AI. Nos primeiros, o HPV 16 foi o mais freqüente (62%), enquanto que nos casos invasores foi o 18 em 56%, demonstrando uma maior agressividade e chance para invasão deste último.

3.5 HPV EXTRA-GENITAL

O trato genital feminino é o mais estudado sítio de infecção do HPV. Vários métodos diagnósticos foram desenvolvidos nos últimos anos. Os métodos de Hibridização Molecular do DNA são os mais utilizados atualmente.

Os métodos de Hibridização Molecular “in situ” permitem localizar o DNA viral no núcleo das células infectadas. Este ponto é particularmente importante para o estudo dos adenocarcinomas endometriais, por exemplo, uma vez que o tecido maligno cresce em continuidade com a mucosa escamosa e pode ser responsável por resultado falso (+) por contaminação (Shroyer, 1993). A sensibilidade de detecção, entretanto, é altamente dependente do método utilizado, dificultando muitas vezes os estudos comparativos.

A Hibridização do DNA pela técnica de Southern blot é altamente sensível na detecção das seqüências do DNA. Entretanto, é limitado para o uso de tecido fresco, não fixado, é uma técnica laboriosa, dificultando a realização em um grande número de casos (Cesarino e cols, 1995).

A Hibridização do DNA Dot blot tem muitas das vantagens do Southern blot, incluindo a sensibilidade e especificidade da determinação do tipo de HPV. É menos laborioso, uma vez que a separação eletroforética do DNA e a transferência capilar para uma membrana é eliminada (Shroyer, 1993).

A sensibilidade de detecção pelo Dot blot é de 1 pg de DNA viral. Assumindo que a média do genoma do HPV inclui 8.000 pares de bases, este nível de sensibilidade é equivalente a aproximadamente 59.000 moléculas de HPV.

Com avanço da biologia molecular, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) se torna uma importante ferramenta na detecção da infecção viral. O PCR é um método que consiste na amplificação “in vitro” de segmentos de DNA (Mies, 1994). A descrição da técnica de PCR, para estudo retrospectivo de material fixado em formol e embocado em parafina, possibilitou a análise rápida e sensível do DNA de HPV em tecidos procedentes de cirurgia (Shibata, 1988). A sensibilidade do PCR na detecção do HPV em material parafinado é 10 vezes maior que a hibridização Southern blot (Young e cols, 1989). Usando seqüência de *primers* HPV L1, o PCR tem uma sensibilidade de detecção para 10 cópias de plasmídeo DNA do HPV (equivalente a 100-500 HPV) por reação (Bauer e cols, 1991).

A sensibilidade dos sistemas de detecção do DNA HPV variam muito nos diversos experimentos da literatura. Há a necessidade de se escolher um método *standard* para a detecção viral, incluindo *primers* e *probes* para se homogeneizar os resultados dos estudos. Por outro lado, a detecção do DNA HPV em amostras antigas de tecido diminui ano a ano. Amostras obtidas imediatamente após a cirurgia ou até 2 meses apresentam uma positividade aos testes diagnósticos muito maior (Tsuhaiko e cols, 1998). Todos estes fatores devem ser considerados no momento de se avaliar os resultados obtidos pelos diversos trabalhos conflitantes na literatura.

3.5.1 TRATO URINÁRIO

3.5.1.1 URETRA

Aproximadamente 5% dos pacientes com verruga genital apresentam envolvimento clínico da uretra. Esfregaços citológicos da uretra de parceiros masculinos de mulheres com infecção cervical pelo HPV apresentam 53% de alterações citológicas compatíveis com HPV intra-uretral (Wiener & Walther, 1995).

Quando as técnicas de hibridização molecular são aplicadas em escovados uretrais de parceiros de mulheres HPV (+) estes apresentam DNA HPV em cerca de 52%, sendo que 69% destes esfregaços apresentam os HPV de alto risco oncogênico. A uretra masculina pode servir como um reservatório para o HPV, entretanto, o potencial de induzir doença intrauretral não está bem definida (Wiener & Walther, 1995).

Os percentuais de HPV associados ao carcinoma de uretra são pouco conhecidos, sendo relatado por Wiener & Walther, 1995 como sendo de 59%.

3.5.1.2 BEXIGA

A presença do HPV no câncer de bexiga é a mais controversa associação do HPV e tumores do trato gênito-urinário. A presença de doença benigna na bexiga parece ser um evento raro. Na literatura inglesa foi descrito 16 casos de condiloma acuminado neste sítio. Destes, 4 eram em pacientes imunodeprimidos (Wiener & Walther, 1995). O estado imune do paciente parece ser preponderante para a presença do HPV na bexiga.

É questionável o resultado encontrado por Rotola e cols, 1992, que encontraram, utilizando a técnica de PCR, o HPV 16 em 77% e 6 e 11 em 56% nos casos de câncer vesical. A prevalência do vírus em tecido vesical saudável também foi muito alta: 88% continham o HPV 16 e 67% o HPV 6 e 11.

Wilczynski e cols, 1993, analisaram 300 casos de tumores do trato gênito urinário (257 de colo uterino, 33 de vulva, 4 de vagina, 2 de ânus e 22 de bexiga) e encontraram apenas 3 casos positivos (2 em colo e 1 na bexiga), todos HPV 6, utilizando a técnica de Southern blot e PCR. Definitivamente estes resultados não podem ser considerados.

Agliano e cols, 1994, encontraram o HPV 16 e/ou 18 em 50% dos casos de carcinoma vesical e em nenhum nas amostras de tecido normal.

Os trabalhos mostram que a presença do HPV no carcinoma de bexiga não ultrapassa 10%. Alguns destes trabalhos utilizaram amostra de tecido vesical trans-uretral, podendo haver alguns casos com contaminação favorecendo os resultados falso (+) (Wiener & Walther, 1995).

3.5.1.3 PRÓSTATA

A importância do estudo do câncer de próstata associada ao HPV está baseado no fato das evidências epidemiológicas deste câncer como uma doença de transmissão sexual e o fato de ser o câncer mais freqüente no homem (Wiener & Walther, 1995).

McNicol e Dodd (1990) demonstraram uma grande associação entre a infecção HPV e o câncer e a hipertrofia benigna de próstata. Usando a técnica de PCR, o HPV 16 foi encontrado em 60% dos casos de hiperplasia e 52% dos adenocarcinomas (Wiener & Walther, 1995).

Rotola e cols, 1992, tem encontrado percentuais elevados da presença do HPV em próstata. O HPV 16 em 75% e o 6 e 11 em 50% dos carcinomas e HPV 16 em 82% e 6 e 11 em 65% dos casos de hiperplasia prostática benigna.

Outros pesquisadores, porém, não tem encontrado percentual semelhante. Iwasawa e cols, 1992, não encontraram nenhum caso HPV DNA (+) em vários casos de câncer e hiperplasia prostática benigna.

Devido a muitos resultados conflitantes e as características próprias dos HPVs de estarem associados principalmente a lesões escamosas e a grande maioria das infecções uretrais estarem confinadas ao 1/3 distal da uretra, parece que o HPV não tem um papel importante na carcinogênese prostática (Wiener & Walther, 1995).

3.5.1.4 RIM E URETER

Rotola e cols, 1992 tem analisado múltiplas amostras de tecido benigno e maligno do trato urinário superior, encontrando novamente alta prevalência do HPV. O HPV 16 foi detectado em 63% e 100% dos carcinomas de rim e ureter, respectivamente e o HPV 6 e 11 em 56% e 50% destes casos, respectivamente. O HPV 16 foi encontrado em 100% e o 6 e 11 em 50% dos tecido sadios. . Da mesma forma que para a próstata e bexiga, os resultados extremamente altos destes pesquisadores, incomum a outros estudos, devem ser avaliados com cautela.

3.5.2 TRATO AERODIGESTIVO

3.5.2.1 CAVIDADE ORAL

Chang e cols, 1989, demonstraram alta prevalência (76%) da infecção HPV nos casos de carcinoma epidermóide oral. Portugal e cols, 1997, no entanto, encontraram o HPV em apenas 11% dos casos de carcinoma oral.

O epitélio do trato aero-digestivo superior é similar ao da ectocérvice e vagina e a presença do HPV nestas áreas é freqüente (Pillai & Nair, 2000). Neste local os tumores existem em ambas as formas pré-invasivas e invasivas e múltiplas lesões podem estar presentes no mesmo paciente, tanto simultaneamente como seqüencialmente. O carcinoma destas áreas sempre esteve associado ao fumo (90% dos casos) e álcool (risco de 6 vezes) e talvez seja acentuado pela infecção HPV (Portugal e cols, 1997; Saito e cols, 1999; Pillai & Nair, 2000).

Estudos “in vitro” tem demonstrado um possível papel etiológico do HPV na carcinogênese do trato aero-digestivo alto. Células do tipo ceratinócitos da cavidade oral transfectadas com o HPV 16 não são tumorigênicas, mas se tornam tumorais quando tratadas com benzopireno, N-nitrosamina e N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, derivados

carcinogênicos do fumo (Kim e cols, 1993; Pillai & Nair, 2000). Estes resultados suportam o conceito de aumento da suscetibilidade carcinogênica relacionada ao fumo em indivíduos infectados pelo HPV. É possível que o HPV interaja com os genes celulares e cause o dano genético inicial que é aumentado ou acelerado pelos derivados carcinogênicos do fumo, ou vice-versa.

3.5.2.2 LARINGE

O HPV, principalmente os tipos 6 e 11, são bem conhecidos na laringe, principalmente em função da papilomatose laringéia juvenil (Lorincz e cols, 1992).

A associação do câncer de laringe e a infecção HPV é maior com o tipo 30 do que o 16 e 18 (Brachman e cols, 1992).

Caruso e Valentini em 1997 analisaram 10 amostras de epitélio escamoso da laringe com displasia e 12 com carcinoma quanto à hiperexpressão de p53 e associação com o HPV. A expressão de p53 foi encontrada em 64% dos casos. O HPV foi isolado em apenas 1 caso de carcinoma. A técnica de detecção do HPV pelos autores, imunohistoquímica e hibridização “in situ” pode ter interferido na positividade dos exames, pois este último é mais sensível para lesões iniciais pelo HPV, onde, múltiplas cópias epissômicas estão presentes, mas falha em detectar o vírus integrado ao genoma celular, como acontece nas lesões de alto grau e carcinoma.

O papel do contato sexual oro-genital e a contaminação do trato aerodigestivo pelo HPV permanece ainda desconhecido. Entretanto, há evidências que mulheres com câncer do trato aerodigestivo HPV 16 e 18 positivos, apresentem os mesmos tipos de HPV na cérvix uterina (Caruso e Valentini, 1997).

3.5.2.3 PULMÃO

Tsuhako e cols, 1998 avaliaram 23 casos de carcinomas adenoescamosos de pulmão e encontraram 18 casos (78%) positivos para o DNA HPV, utilizando técnicas de PCR e hibridização “in situ”.

É possível que a infecção pulmonar pelo HPV tenha origem no colo uterino e atinja os pulmões via hematogênica, pois Tseng e cols em 1999 demonstraram a presença de RNAm de HPV16 e 18 no sangue periférico de mulheres com câncer cervical avançado.

Cheng e cols, 2001, hipotetizaram que os HPVs de alto risco 16 e 18 poderiam estar associado ao câncer de pulmão em mulheres. Os autores avaliaram 141 casos de câncer de pulmão e 60 controles e encontraram uma diferença estatisticamente significativa na positividade do HPV, pois 54,6% dos casos apresentavam o HPV 16/18, enquanto que apenas 26,7% foram positivos para os mesmos vírus, no grupo controle. Em adição, o método de hibridização “in situ” mostrou a presença do HPV de maneira uniforme nas células tumorais, mas não nas células normais adjacentes. Outro achado curioso é que mulheres de maior idade, com mais de 60 anos, e não fumantes apresentavam um risco muito maior de câncer de pulmão, com um OR= 10,12 (95% IC 3,88-26,38). Este fato poderia sugerir que o HPV 16/18 estaria relacionado ao câncer de pulmão em mulheres não fumantes.

3.5.2.4 ESÔFAGO

O envolvimento do HPV nas lesões esofágicas, incluindo carcinomas, tem sugerido uma possível associação de causa e efeito. Porém, uma presença regular e constante do vírus na mucosa esofágica não tem sido demonstrada, permanecendo incerto o papel destes vírus na carcinogênese. O DNA HPV tem sido frequentemente mostrado nos casos de carcinoma de células escamosas do esôfago na China, África do Sul e Portugal, mas raramente no Japão e EUA (Tshako e cols, 1998).

Toh e cols em 1992 pesquisaram a presença do HPV, pela técnica de PCR, em 45 biópsias de carcinoma de células escamosas do esôfago. O HPV 16/ 18 foi encontrado em 6,7% dos casos. Togawa e cols, 1994 e Chang e cols, 1993 também demonstraram a presença de sequências do DNA do HPV nos casos de adenocarcinoma de esôfago.

Morgan e cols descreveram em 1997 a possível correlação da hiperexpressão dos produtos do gen supressor tumoral p53 com infecções virais e o adenocarcinoma de esôfago. Os pesquisadores avaliaram a presença de viroses que poderiam estar associadas a estes carcinomas, como o HPV, Adenovírus tipo 12, Epstein-Barr Vírus (EBV) e Citomegalovírus. A hiperexpressão do p53 foi identificada em 65% dos casos e apenas o EBV foi detectado, mas na mesma proporção do tecido sadio (47%).

3.5.2.5 CÓLON, RETO E ANUS

Estudos de hibridização tem encontrado a presença de DNA HPV, principalmente o 16, em 39-50% dos casos de carcinomas escamosos do ânus (Wiener & Walther, 1995). Carter e cols, 2001, avaliando 109 casos de câncer anal “in situ” e invasivo, encontraram 50% e 39% de soropositividade ao HPV 16, enquanto que no grupo controle foi de apenas 15,2%. O OR para o carcinoma “in situ” foi de 5,7 (95% IC 2,8-11,6) e para o carcinoma invasor de 3,8 (95% IC 2,3-6,3).

Palefsky e cols, 2001 encontraram o HPV em 85% dos casos de carcinomas escamosos do ânus.

Frizelle e cols, 2001 avaliaram 6 casos de carcinoma escamoso de cólon e reto quanto à presença do HPV pelo método de hibridização “in situ” e não encontraram nenhum caso positivo.

Carter e cols, 2001 avaliaram 1782 casos de câncer anogenital e 2.383 controles quanto à presença de anticorpos anti-HPV 16 e 18. O aumento do risco de câncer associado à soropositividade do HPV 16 variou de OR=1,8 (95% IC 1,4-2,5) para o adenocarcinoma de colo uterino a OR=5,9 (95% IC 3,4-10,3) para o câncer anal em homens.

3.5.3 OUTROS LOCAIS

3.5.3.1 CONJUNTIVA E SACO LACRIMAL

Nakamura e cols, 1997, avaliaram 17 pacientes com tumores benignos e malignos da conjuntiva e saco lacrimal. Aproximadamente 50% dos tumores escamosos da superfície ocular e saco lacrimal foram associados com a infecção HPV. O epitélio destas lesões são de células escamosas, como do trato genital inferior. A coilocitose também é vista nestes tecidos e também é um indicador de infecção HPV no olho. Os autores concluem que a infecção HPV pode estar associada à etiologia dos tumores escamosos destes locais, associado a outros cofatores.

3.5.3.2 SARCOMA DE KAPOSI

Huang e cols em 1992 avaliaram 97 casos de Sarcoma de Kaposi, utilizando a técnica de PCR, em pacientes HIV positivos e negativos e encontraram seqüências do HPV 16 em 20% dos casos.

3.6 PRESENÇA DO HPV NA CAVIDADE ENDOMETRIAL

Lai e cols, 1992, sugerem que há no mínimo 3 possíveis rotas da infecção HPV no trato genital superior: superficial ascendente, translinfática e hematogênica. Zimna e cols, 1997 acrescentam que o vírus pode ser transportado como partícula livre ou carreado por linfócitos. A partícula viral pode ser transportada pelos linfócitos principalmente quando há necrose tecidual ou inflamação crônica.

Utilizando a técnica de hibridização por Southern blot, vários autores (Ostrow e cols, 1987, Bergeron e cols, 1988, Wilezynski e cols, 1988 e Nielsen, 1990) não encontraram a presença do DNA HPV em tecido endometrial normal. O'Leary e cols em 1998 examinaram amostras endometriais de 10 mulheres normais pela técnica de PCR e também não identificaram seqüências do DNA HPV em nenhum caso.

Lai e cols, 1992, no entanto, encontraram seqüência de DNA HPV em 70% dos tecidos endometriais benignos e Fujita e cols, 1995 mostraram positividade ao DNA HPV 16 em casos de endométrio com hiperplasia.

Sherwood e cols em 1997 demonstraram a presença do HPV 6 e 11 em um caso de metaplasia escamosa extensa com foco de lesão intraepitelial de baixo grau de endométrio coexistindo com lesão intraepitelial de baixo grau e carcinoma escamoso invasivo de vagina.

Vários trabalhos evidenciaram a infecção da cavidade uterina pelo HPV também durante a gestação. Tseng e cols, 1992 identificaram o HPV em células mononucleares de mulheres e sangue do cordão de seus filhos. Hermonat e cols, 1998 detectaram DNA HPV nas células do sinciotrofoblasto de aborto espontâneo em mulheres HPV positivas.

Mais tarde, Eppel e cols, 2000, analisaram 179 mulheres grávidas quanto à presença do HPV por PCR e encontraram 44 casos positivos (24,6%). Em 147 casos o DNA HPV também foi analisado em amostras placentárias por biópsia de vilo corial transabdominal, todos negativos. Os autores concluíram que o HPV pode estar presente na cavidade uterina também de mulheres grávidas. Não houve repercussão negativa para a mãe ou para o feto deste achado, a não ser pelo fato das infecções cervicais pelos HPV de baixo risco estarem associadas com um maior risco de cariótipo fetal anormal.

A rota pela qual o HPV infecta o compartimento fetal, como o cordão umbilical ou líquido amniótico, é desconhecida. A via hematogênica parece ser a mais provável, mas ainda não tem sido bem documentada.

3.7 ASSOCIAÇÃO DO HPV E O CARCINOMA ENDOMETRIAL

O adenocarcinoma do endométrio apresenta características epidemiológicas semelhantes ao adenocarcinoma do colo uterino (Parazzini & La Vecchia, 1990; Hording e cols, 1997). Vários trabalhos na literatura tem tentado encontrar algum fator comum para estas neoplasias. Nos últimos anos vários autores tem procurado uma associação com a infecção HPV, mas os resultados tem sido muito divergentes.

De Villiers e cols em 1986 relataram a habilidade do HPV em transformar as células epiteliais superficiais ovarianas humanas, sugerindo que o HPV é capaz de induzir neoplasia no trato genital superior feminino.

Kealy e cols em 1990 encontraram a presença do DNA HPV nos casos de adenoacantomas endometriais. Os mesmos autores relataram em 1994 a identificação de alterações celulares semelhantes ao coilócito no epitélio escamoso de alguns adenoacantomas endometriais que são tumores epiteliais mistos que se assestam em um endométrio composto de áreas glandulares associados a áreas benignas de metaplasia escamosa. Já os carcinomas adenoescamosos apresentam áreas malignas de epitélio glandular e escamoso (Salazar e cols, 1977). A origem de ilhas de epitélio escamoso benigno e maligno nos tumores endometriais tem sido motivo de muitas especulações, com algumas considerando uma origem das células glandulares endometriais metaplásicas (O'Leary e cols, 1998).

Os estudos tem sido conflitantes em relação à identificação do DNA HPV em lesões benignas e malignas do endométrio (Bergerson e cols, 1988; Fugita e cols, 1995; O'Leary e cols, 1998). Ostrow e cols, 1987, Bergeron e cols, 1988, Wilezynski e cols, 1988 e Nielsen, 1990, não encontraram a presença do DNA HPV em tecido endometrial com carcinoma, utilizando a técnica de hibridização por Southern blot. Por outro lado, Macnab e cols, 1986, utilizando a mesma técnica, relataram 2 casos de carcinoma endometrial contendo DNA do HPV 16.

Wong e cols, 1993, utilizando a técnica de PCR e pesquisando o DNA HPV em carcinoma endometrial e colo normal correspondente, demonstraram a presença do DNA HPV 16 em 1 dos 22 casos (4,5%) de carcinoma endometrial avaliados. O tecido cervical do mesmo caso também se mostrou infectado pelo mesmo tipo viral. A detecção de seqüências de DNA de HPV no endométrio pela técnica de PCR, muito mais sensível requer cuidadosa interpretação devido ao risco de contaminação pelo colo uterino.

Outros estudos, no entanto, tem encontrado um percentual maior de HPV nestes tumores. Fujita e cols, 1995 mostraram positividade ao DNA do HPV 16 em 13% dos carcinomas endometriais. Índice muito maior foi visto por Lai e cols, 1992, que encontraram seqüências do DNA de HPV em 37,5% dos carcinomas endometriais.

Im e cols, 1995 tentaram demonstrar a presença do HPV nos casos de carcinomas escamosos do endométrio, procurando uma correlação com o mesmo tipo de câncer no colo uterino, mas não encontraram o vírus em nenhum dos três casos examinados. Kataoka e cols, 1997 encontraram apenas 1 caso de carcinoma de células escamosas do endométrio associado ao HPV, sendo encontrado o tipo 31.

Sworn e cols, 1995 relataram um caso de carcinoma "in situ" de colo uterino com envolvimento focal (não contíguo) endometrial e ovariano unilateral, sem envolvimento tubário, também associado ao HPV, suportando a idéia de processo oncogênico independente, talvez associado ao HPV. Da mesma forma, Pins e cols, 1997, descreveram

um caso de carcinoma escamoso “in situ” de colo uterino com extensão intraepitelial para o endométrio e invasão para trompas e parênquima ovariano, associado ao HPV 16.

Fujita e cols, 1996, analisando 5 casos de adenocarcinomas concomitantes de endométrio e ovário, diagnosticados como tumores primários sincrônicos, detectaram a presença do HPV 16 em 7% dos casos de adenocarcinoma endometrial e em nenhum dos tumores ovarianos. Por outro lado, Zimna e cols, 1997, estudaram a presença do HPV nos carcinomas de ovário (21 casos) e endometrial (37 casos) e observaram que 30% dos carcinomas endometriais e 40% dos ovarianos apresentaram seqüências do DNA HPV 18. Não encontraram, porém, nenhum caso de DNA do HPV 16.

Hachisuga e cols, 1996 avaliaram o possível papel do HPV e da hiperexpressão de p53 nos carcinomas cervicais, do segmento uterino baixo e endometrial. O HPV DNA não foi detectado no carcinoma endometrial (30 casos), mas a hiperexpressão e mutação de p53 foi encontrada em 12 (40%) dos casos.

Hording e cols em 1997 hipotetizaram a possibilidade de diferenciar um adenocarcinoma endometrial dos adenocarcinomas endocervicais utilizando a pesquisa do DNA HPV por PCR. Os autores encontraram DNA HPV em 70% dos adenocarcinomas endocervicais (50 casos estudados) e em nenhum caso de carcinoma endometrial (23 casos estudados).

O’Leary e cols em 1998 examinaram amostras endometriais de 20 mulheres com adenocarcinoma endometrióide, 41 com adenocarcinomas com metaplasia escamosa (adenoacantomas) e 2 com carcinomas adenoescamosos, quanto a presença do DNA do HPV pela técnica de PCR. Nos adenocarcinomas endometrióides, o DNA HPV foi identificado em 2/20 (10%) dos casos, ambos HPV do tipo 11. Nos adenoacantomas, o HPV de baixo risco (tipo 6) foi encontrado em 9/41 (22 %) dos casos. Infecção mista por 2 tipos de HPVs foi encontrada em 2 casos. Nos carcinomas adenoescamosos, um caso mostrou infecção mista com HPV 6 e 33.

Lininger e cols, 1998, detectaram a presença do HPV 16 em 25% dos casos de tumores de células transicionais do endométrio e em 67% destes tumores no colo uterino. A neoplasia de células transicionais é um interessante modelo tumoral por ser intermediário entre o carcinoma de células escamosas e os adenocarcinomas. Há evidências crescentes da importância de vários tipos de HPV na patogênese de várias neoplasias em sítios primários diferentes. A ausência dos tipos de HPV de baixo risco nestes casos de neoplasias de colo e endométrio suportam a hipótese que o HPV 16, principalmente, é um fator causal e não apenas associado nos tumores de células transicionais. Mas, evidência direta como agente causal para o HPV é difícil de avaliar na ausência de clonalidade, integração do genoma celular ou expressão de E6 e E7 (Lininger e cols, 1998).

Quanto ao tipo de HPV envolvido, Semczuk e cols, 2000, avaliaram 54 casos de carcinoma endometrial quanto à frequência do HPV 16 e 18, pela técnica de PCR. O HPV 16 esteve presente em 11 casos (20%) enquanto que o HPV 18 em somente 3 (4%). Não houve diferença estatisticamente significativa quando avaliada a presença do HPV e o grau de diferenciação tumoral.

Hisada e cols em 2001, avaliaram a associação da presença de anticorpos anti-HPV 16 e o risco subsequente do desenvolvimento do carcinoma cervical, endometrial e ovariano. Foram avaliados os soros de 15.000 mulheres, sendo que posteriormente 152 desenvolveram câncer (83 de colo, 34 de endométrio e 35 de ovário) e foram comparados com 172 controles. A soropositividade ao HPV 16 esteve associada ao carcinoma cervical

(OR=2,0 95% IC 1,0-3,4) mas não ao carcinoma endometrial (OR=1,6 95% IC 0,6-3,8) e ovariano (OR=1,1 95% IC 0,4-2,8).

A aparente segregação dos HPV de baixo risco (HPV 6 e 11) no epitélio escamoso metaplásico e HPV de alto risco (HPV 16, 18 e 33) no epitélio escamoso e glandular maligno dos carcinomas endometriais, levanta importantes questões em relação ao papel dos HPV de baixo risco oncogênico nas manifestações benignas e os HPV de alto risco nos tumores malignos propriamente ditos, sendo portanto, possível o papel dos HPV na oncogênese endometrial, semelhante ao que acontece com o colo uterino.

4 SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 - DESENHO (TIPO DE ESTUDO)

Tratou-se de um estudo observacional do tipo Caso-Controle.

4.2 - TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho da amostra foi avaliado levando em consideração que, segundo a literatura, a prevalência do HPV no Carcinoma de Endométrio é em torno de 25% e no tecido endometrial normal inferior a 3% (Lininger, 1998; O'Leary, 1998).

Assumindo a razão de 1:1 no tamanho dos 2 grupos e aplicados ao cálculo padrão da amostra (Epi-Info 6,04), com chance de 3% para o grupo controle e 25% para os casos, os resultados mostraram que uma amostra de 92 mulheres (46 com carcinoma e 46 sem carcinoma) seria adequada para uma avaliação com poder estatístico de 80% e um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para tanto, analisamos 50 amostras de tecido endometrial com carcinoma e 50 de tecido endometrial normal.

4.3 - SELEÇÃO DOS SUJEITOS

4.3.1- Casuística

Foram avaliadas 50 mulheres submetidas à histerectomia pelo Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário/UFSC, Hospital das Clínicas/UFPR e Clínica Privada, portadoras de Carcinoma Endometrial (Grupo I) e 50 mulheres, também submetidas a histerectomia, portadoras de outras patologias (não malignas), com endométrio normal à histopatologia (Grupo II).

4.3.2 - Critérios de Inclusão

Grupo I: Mulheres que foram submetidas a tratamento cirúrgico por carcinoma endometrial, comprovado histologicamente.

Grupo II: Mulheres que foram submetidas a tratamento cirúrgico (histerectomia) por outras patologias, cuja avaliação do patologista demonstrou a presença de tecido endometrial normal.

4.3.3 - Critérios de Exclusão

Grupo I:

1. Os casos de carcinoma endometrial cujo sítio primário da lesão era duvidoso, com a possibilidade de tratar-se de um carcinoma de colo uterino ou órgão contíguo (bexiga, reto) com invasão endometrial.
2. Mulheres com história prévia de carcinoma do trato genital inferior tratado ou não.
3. Mulheres com história prévia ou presente de lesões pré-neoplásicas do trato genital inferior.

Grupo II:

1. Todos os casos em que havia a presença de lesão pré-neoplásica do endométrio (hiperplasias endometriais) e do trato genital inferior.
2. Mulheres que foram submetidas no passado a algum tratamento antineoplásico (radioterapia ou quimioterapia) para qualquer tipo de neoplasia.

4.4 - VARIÁVEIS E CATEGORIAS

4.4.1 - Variável Dependente

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO (Hendrickson & Kempson, 1997))

O diagnóstico histológico do tecido endometrial foi dividido em 2 categorias:

- ***Tecido Endometrial Normal:*** Constituído por glândulas, estroma e arteríolas que se modificam de acordo com o período menstrual por ação do Estrogênio e Progesterona. A ação estrogênica da primeira fase (proliferativa ou folicular) foi avaliada histologicamente pela grande quantidade de glândulas com pseudo-estratificação do epitélio glandular, maior densidade da cromatina nuclear, presença de mitoses no estroma e pela densidade do estroma endometrial. A ação progesterônica na segunda fase do ciclo (secretora ou lútea) modifica as glândulas, que adquirem aspecto alongado e tortuoso com projeções papilíferas para sua luz, com vacuolização citoplasmática. O estroma torna-se edemaciado com transformação pseudo-decidual. Também foram considerados como normal os casos de atrofia endometrial em pacientes menopausadas, definido como revestimento endometrial constituído apenas pela camada de células basais e o estroma endometrial compacto e com glândulas tubulares simples remanescentes, não proliferativas e não secretoras.
- ***Tecido Endometrial Neoplásico:*** Caracterizou-se por estruturas glandulares e/ou massas sólidas de células epiteliais semelhantes às células endometriais, porém em desarranjo arquitetônico associado a atipia nuclear.

4.4.2 - Variável Independente

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO HPV POR PCR

A presença do HPV foi determinada utilizando a técnica denominada *Polymerase Chain Reaction* (PCR), descrita com detalhes nos *Procedimentos*.

Esta variável foi dividida em 2 categorias:

- **POSITIVA**: quando detectado a presença do DNA viral no material analisado.
- **NEGATIVA**: quando não detectado a presença do DNA viral no material analisado.

Os casos positivos foram posteriormente classificados de acordo com o tipo viral, identificado pela Técnica de Hibridização Dot blot.

4.4.3 - Variáveis de Controle

4.4.3.1- IDADE DAS PACIENTES

Variável contínua que posteriormente foi dividida em 2 categorias:

- **Pacientes com idade ≤ 50 anos**: definido como as pacientes com idade inferior ou igual a 50 anos e 364 dias no dia da cirurgia.
- **Pacientes com idade > 50 anos**: definido como pacientes com idade superior ou igual a 51 anos no dia da cirurgia.

As mulheres foram divididas nestas duas categorias de idade como uma medida aproximada do status menopausal, uma vez que esta informação exata não se tinha de todas as mulheres. A idade média da menopausa nas mulheres brasileiras está por volta dos 50 anos (Ferreira, 1999). A seleção de qualquer idade específica como ponto de corte para a menopausa é arbitrária, pois ela não ocorre na mesma época em todas as mulheres, mas um período semelhante para a maioria das mulheres é uma alternativa.

4.4.3.2- FUMO

Devido à história natural do câncer, os casos foram divididos em 2 categorias:

- **Não Fumantes**: definidas como as mulheres que nunca fumaram ou que fumaram por um período inferior a 6 meses.
- **Fumantes**: definidas como as pacientes que fumam (pelo menos 1 cigarro/dia) ou que já fumaram por período superior a 6 meses.

4.4.3.3- TIPO HISTOLÓGICO DO CARCINOMA ENDOMETRIAL (Bacchi e cols, 1999; Ronnett e cols, 2002)

Distinguiu-se duas categorias:

- ***CARCINOMA ENDOMETRIAL COM COMPONENTE ESCAMOSO***

Foram englobados todos os casos de carcinoma endometrial que apresentaram algum componente escamoso, como ocorre com os seguintes tipos histológicos:

* *Adenoacantoma*: adenocarcinoma que apresenta associado componente escamoso citologicamente benigno, ou seja, células bem diferenciadas com mínima atipia nuclear, usualmente proliferando dentro do lúmen glandular, formando a chamada mórula. Também são denominados de adenocarcinomas com metaplasia escamosa. É responsável por 10-15% dos casos.

* *Carcinoma Adenoescamoso*: adenocarcinoma que apresenta componente escamoso também maligno. Os critérios histológicos são os mesmos do adenocarcinoma endometrióide associado aos do carcinoma epidermóide.

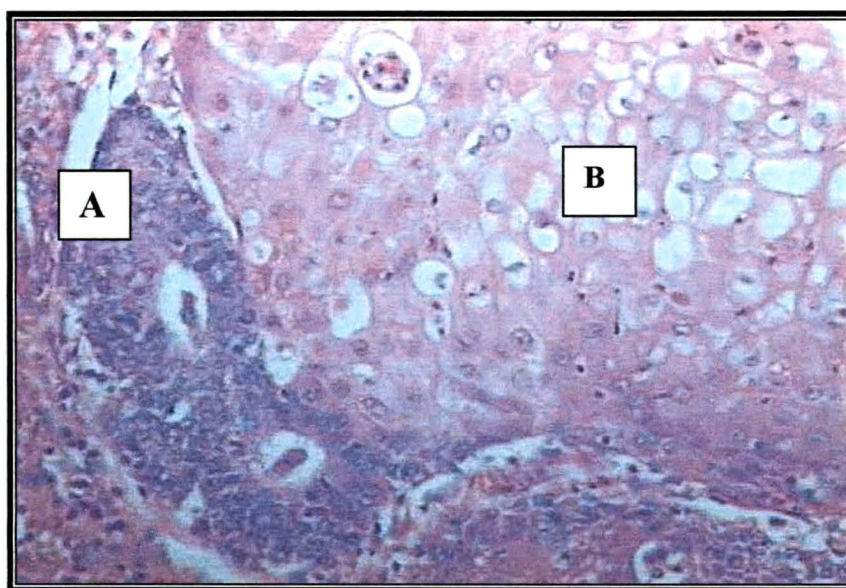


Figura 3: Carcinoma adenoescamoso: componente escamoso (A) associado ao componente endometrióide (B), ambos com característica maligna (HE, 100x)

- *Carcinoma Epidermóide*: tumor extremamente raro no endométrio em sua forma pura. Ocorre em pacientes muito idosas e é extremamente agressivo. Frequentemente representa a propagação de um carcinoma epidermóide de colo uterino e geralmente está associado à estenose cervical, piométrio e inflamação crônica.
- ***CARCINOMA ENDOMETRIAL SEM COMPONENTE ESCAMOSO***

Foram englobados todos os casos que não apresentam componente escamoso associado, ou seja:

* *Adenocarcinoma Endometrióide*: tipo mais comum (70% dos casos), sendo compostos por estruturas glandulares e/ou massas sólidas de células epiteliais semelhantes às células do endométrio com sinais de malignidade (atipia nuclear).

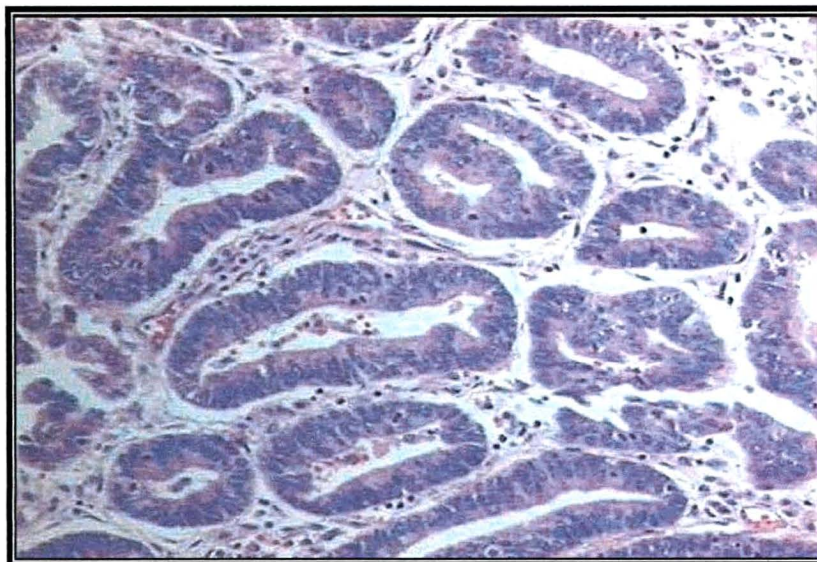


Figura 4: Adenocarcinoma endometrióide: glândulas endometriais com atipia nuclear (HE, 100x)

**Adenocarcinoma Seroso Papilífero:* é histologicamente idêntico ao carcinoma seroso papilífero do ovário, podendo conter corpúsculos psamomatosos (psamomas). Apresentam estruturas papilíferas recobertas por várias camadas de células epiteliais atípicas. Responsável por 8% dos casos.

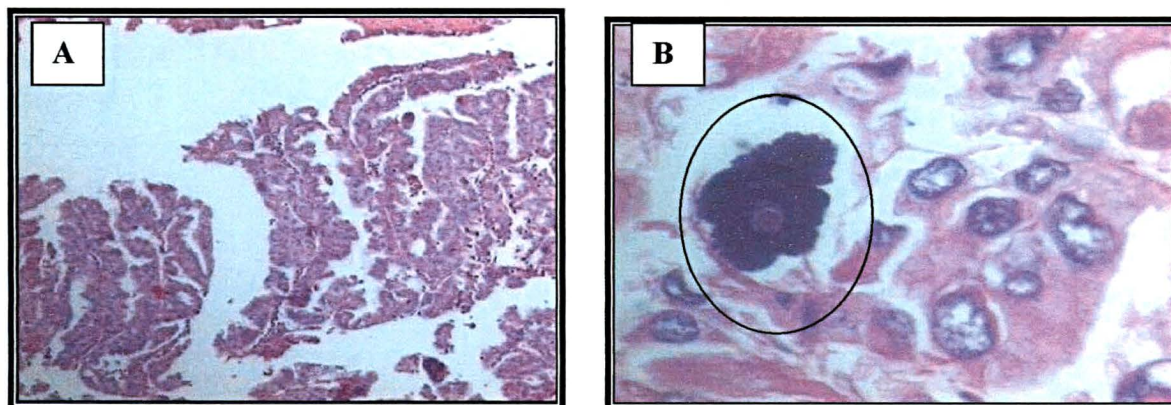


Figura 5: Adenocarcinoma seroso: (A) arranjo papilar de várias camadas de células com atipia nuclear (HE, 100x); (B) psamoma (detalhe) e atipia nuclear (HE, 400x)

** Adenocarcinoma de Células Claras:* também denominado carcinoma mesonefróide, devido a sua semelhança com os tumores originados de restos mesonéfricos. É uma neoplasia rara (1%), pouco diferenciada, sendo o tipo histológico endometrial mais agressivo.

** Sarcoma:* representa 2% dos tumores malignos uterinos. Se caracterizam por uma massa amolecida com aspecto encefalóide ou de “carne de peixe”, com áreas amarelas de necrose ou áreas avermelhadas de hemorragia, infiltrando o miométrio adjacente. Microscopicamente, existe atipia com pleomorfismo nuclear, áreas mixóides e mitoses atípicas. Geralmente apresentam mais de quatro mitoses em dez campos de maior aumento.

4.4.3.4- GRAU DE DIFERENCIAÇÃO (Bacchi e cols, 1999)

4.4.3.4.1 - GRAU HISTOLÓGICO OU ARQUITETURAL

O Grau Histológico reflete a diferenciação do tumor, a semelhança ou não do tecido neoplásico em comparação com o tecido normal de onde o tumor é originário. O adenocarcinoma foi dividido em 3 categorias:

- *Grau Arquitetural I (bem diferenciado)*: células arranjadas em massas arredondadas, por vezes lobuladas, constituindo demarcação nítida entre o tumor e o estroma. Padrão glandular ou papilífero encontrado em quase todo o tumor, podendo ter até 5% de padrão sólido.
- *Grau Arquitetural II (moderadamente diferenciado)*: ninhos grosseiramente angulados e cordões celulares tumorais em meio ao estroma. Padrão glandular ou papilífero predomina no tumor, com áreas sólidas variando de 6 a 50% dos campos microscópicos examinados.
- *Grau Arquitetural III (pouco diferenciado)*: delgadas trabéculas anastomosadas, com uma ou duas células em espessura ou células isoladas, constituindo um arranjo complexo em relação à demarcação com o estroma. Áreas sólidas predominam em mais de 50% do tumor.

4.4.3.4.2 - GRAU CITOLÓGICO OU NUCLEAR

Corresponde às alterações dos núcleos das células tumorais. É mais observado em biópsias ou curetagens do endométrio com material escasso ou com necrose tumoral, sendo mais reprodutível do que o grau histológico. Foram divididos em 3 categorias:

- *Grau Nuclear I*: células com citoplasma abundante. Pleomorfismo e hipercromasia nuclear mínima (núcleos ovais ou alongados, pouco aumentados de tamanho, com cromatina fina). Razão Núcleo/Citoplasma (N/C) baixa (diâmetro nuclear $\leq 1/3$ do diâmetro total da célula). Nucléolos pequenos ou sem nucléolos. Raras mitoses.

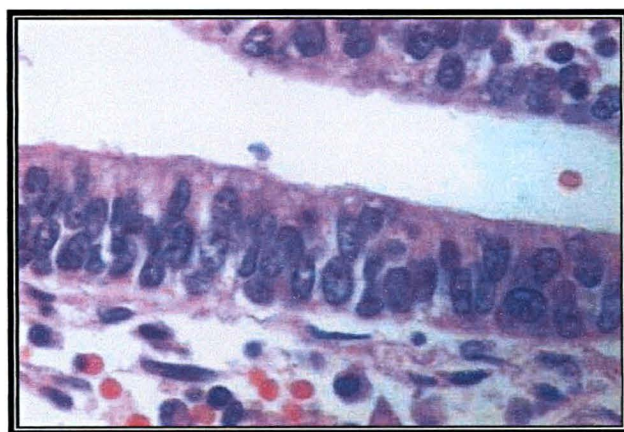


Figura 6: Adenocarcinoma endometrióide grau citológico I (HE, 400x)

- *Grau Nuclear II*: alterações nucleares intermediárias entre as encontradas no Grau I e III. Células com quantidade moderada de citoplasma. Pleomorfismo e hipercromasia nuclear mais proeminente. Razão N/C intermediária (diâmetro nuclear $1/3 - 2/3$ do diâmetro celular). Moderada quantidade de mitoses.

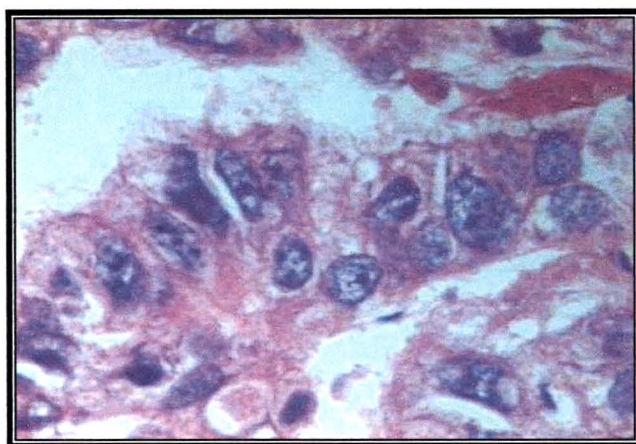


Figura 7: Adenocarcinoma endometrióide grau citológico II (HE, 400x)

- *Grau Nuclear III*: células com quantidade mínima de citoplasma. Pleomorfismo e hiperchromasia nuclear marcante (núcleos redondos, volumosos, com cromatina grumosa grosseira). Razão N/C alta (diâmetro nuclear $\geq 2/3$ do diâmetro celular). Nucléolos irregulares, grandes e múltiplos. Numerosas mitoses.

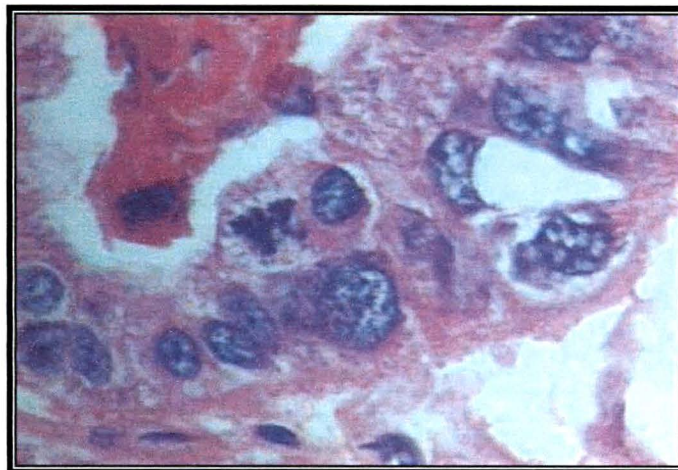


Figura 8: Adenocarcinoma endometrióide grau citológico III (HE, 400x)

4.5 - PROCEDIMENTOS

Foram selecionados 100 blocos de parafina mais representativos de tecido endometrial, avaliados pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário / UFSC, Hospital das Clínicas / UFPR e Laboratório Macro e Micro de Florianópolis, sendo 50 de mulheres submetidas a cirurgia por carcinoma endometrial e 50 de mulheres submetidas a histerectomia por outras afecções. Os dados referentes à idade das pacientes e tabagismo foram pesquisados nos prontuários do Serviço de Arquivo Médico do Hospital Universitário/UFSC, Hospital das Clínicas e Clínica privada. A revisão dos casos quanto ao tipo histológico, diferenciação escamosa e grau de diferenciação foi realizada pelo mesmo patologista, professor do Hospital Universitário / UFSC, titulado pela Sociedade Brasileira de Patologia (SBP).

Os blocos mais representativos foram analisados para a pesquisa do HPV pelo *Método de PCR (Polimerase Chain Reaction)* no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, em São Paulo (Villa, 2000). O princípio das reações de PCR se basearam na repetição de ciclos de 3 etapas:

1. *Desnaturação do DNA*: obtida mediante a brusca elevação da temperatura da amostra analisada para 95°C, por um minuto. Neste momento ocorre a separação da “cadeia dupla” de DNA.
2. *Anelamento ou Hibridização*: ocorre entre a cadeia original de DNA (agora já desnaturada em “cadeia simples”) e a sequência de oligonucleotídeos que se liga à região inicial do DNA a ser amplificado, aumentando o número de cópias.

Estes oligonucleotídeos são denominados de “iniciadores” ou *primers*. A temperatura ótima para esta hibridização inicial varia de 37°C a 70°C, dependendo primariamente do comprimento dos *primers* e de sua sequência de oligonucleotídeos.

3. *Extensão*: a extensão da sequência de nucleotídeos em continuidade com a cadeia “iniciadora” mediada pela DNA-polimerase termoestável ocorre a 72°C, por 1 a 2 minutos. Esta reação dá origem a cópias de nucleotídeos da matriz do DNA da amostra inicial, sendo ampliada a região limitada pelos dois extremos de ligação dos *primers* com a “matriz de DNA”.

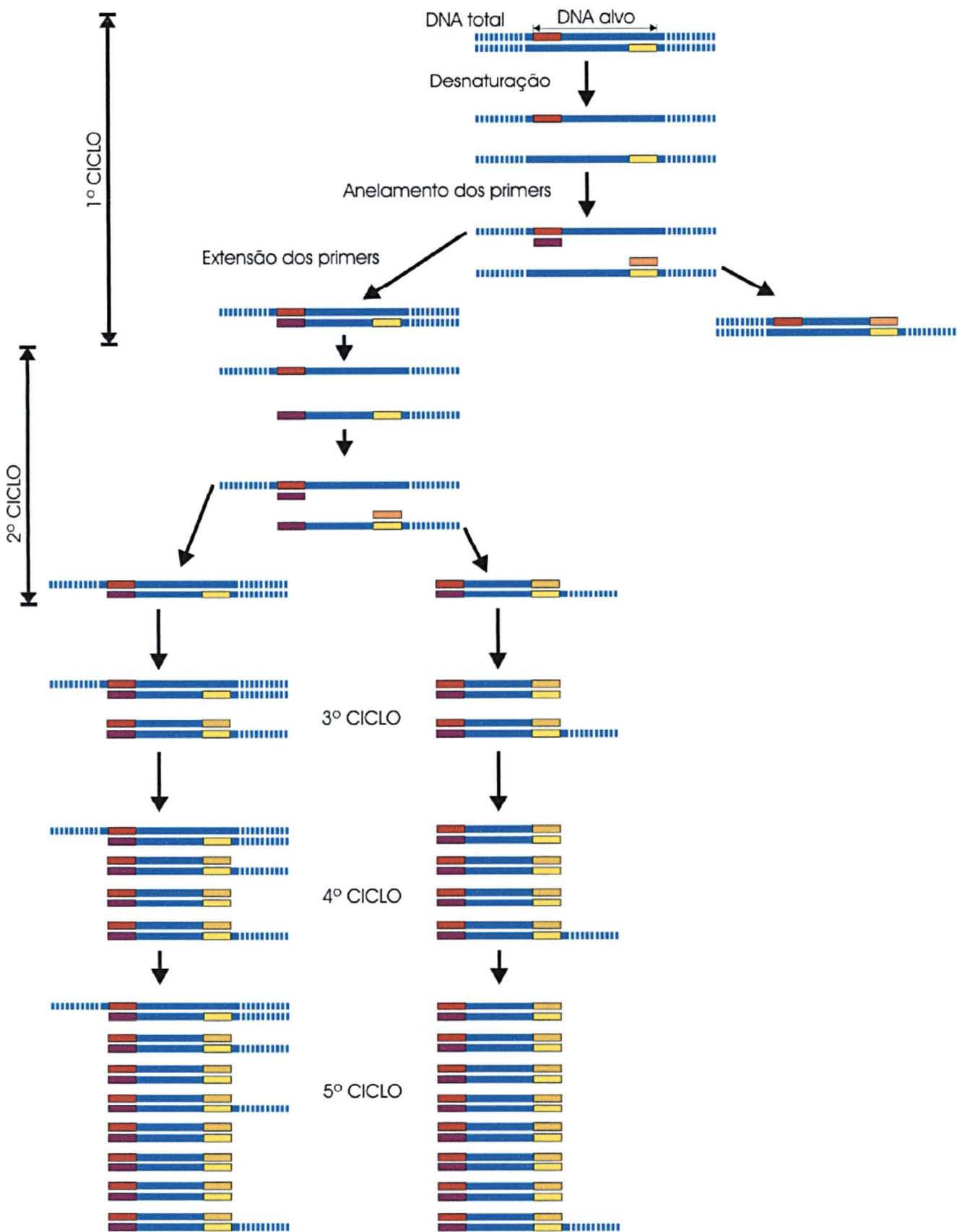
Este ciclo foi repetido 30 a 40 vezes, dando origem a um aumento do produto de amplificação conhecido como *amplicon*. Assim, ao final de n ciclos, a reação teve um número teórico máximo de 2^n moléculas de DNA dupla fita, que são cópias exatas da região específica do DNA molde que foi codificado pelos iniciadores.

Este método permite detectar todos os tipos de HPV, em torno de 40, no casos dos espécimes provenientes da mucosa genital. Para identificação genérica da infecção utilizou-se *primers* que levam a amplificação de sequências gênicas comuns ao maior continente de tipos de HPV (“iniciadores genéricos” ou *general primers*), relacionadas às proteínas estruturais do capsídeo viral. Seguindo-se a amplificação das cópias de DNA viral, as partículas virais foram detectadas e identificadas (tipagem viral) através da técnica de Hibridização *Dot blot*, utilizando-se sondas específicas de HPV, marcadas pelo fósforo radioativo (p32). Os detalhes da “Técnica de extração do DNA a partir do material parafinado”, dos “Métodos para análise dos produtos amplificados por PCR” e da “Tipagem viral por Hibridização *Dot blot*” estão especificados nos Anexos 2 a 5.

Após todas as peças serem testadas com *primers* genéricos, seguidos de hibridização, e *primers* específicos, foram considerados HPV POSITIVOS os casos onde apareceu um sinal indiscutível observado na hibridização *Dot blot* a partir de produtos de amplificação por *primers* genéricos.

Exemplo de todo este processo está ilustrado na página seguinte.

PCR - Polymerase Chain Reaction



4.6- COLETA DE DADOS

Os blocos de parafina do Grupo I (carcinoma endometrial) e Grupo II (endométrio normal) foram selecionados do Arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário/UFSC, do Hospital das Clínicas / UFPR e Laboratório de Anatomia Patológica Macro e Micro. Posteriormente este material foi revisado, segundo as Normas da Sociedade Brasileira de Patologia (Bacchi e cols - SBP, 1999) pelo patologista responsável pela avaliação dos casos. O resultado desta revisão foi documentado em forma de laudo e entregue ao pesquisador que arquivou este documento e transcreveu os resultados ao instrumento de coleta de dados dos casos correspondentes. O bloco mais representativo do endométrio foi enviado ao Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, em São Paulo, para a realização do PCR, sem conhecimento do resultado histopatológico dos espécimes.

Os dados relativos à paciente, como idade e hábito de fumar foram obtidos dos prontuários do SAME dos referidos Hospitais e foram transcritos ao instrumento de coleta de dados de cada caso.

4.7 - PROCESSAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados relevantes, obtidos através da análise dos prontuários dos Serviços de Arquivo Médico e Estatística (SAME) dos hospitais envolvidos na pesquisa, os relatórios revisados do patologista e os resultados do PCR do Instituto Ludwig de São Paulo, foram incluídos no Instrumento para Coleta de Dados. Em seguida foi preparado um programa de entrada de dados, para permitir a digitação e arquivo dos mesmos em banco de dados em computador (PC). Os dados do banco foram submetidos a testes de consistência utilizando programa específico antes de serem processados. Para processamento destes dados foi utilizado o programa estatístico Epi-Info 6 (Statcalc), e o teste estatístico foi realizado através do cálculo de Risco Relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV nas amostras, pelo Teste exato de Fisher com um Intervalo de Confiança de 95%.

4.8 - ASPECTOS ÉTICOS

Como trata-se de um estudo de peça histológica, o consentimento livre e esclarecido foi dispensado, conforme a Resolução 196 que orienta a ética em pesquisa em seres humanos. O cuidado ético fundamental neste caso foi manter em sigilo o nome das mulheres envolvidas na pesquisa. Para tanto, cada caso foi identificado no instrumento de coleta de dados, apenas pelo número do prontuário, iniciais do nome e número do caso da pesquisa.

5 RESULTADOS

5.1- Descrição das características clínico-epidemiológicas dos grupos estudados

As características dos grupos estudados encontram-se na tabela 13, 14 e 15.

TABELA 13 – Avaliação da idade e hábito do tabagismo entre as mulheres portadoras de carcinoma endometrial e grupo controle

CARACTERÍSTICA	CASOS		CONTROLES	
	n	(%)	n	(%)
• IDADE				
- ≤ 50 ANOS	12	(24)	21	(42)
- > 50 ANOS	38	(76)	29	(58)
• TABAGISMO				
- SIM	15	(30)	09	(18)
- NÃO	35	(70)	41	(82)

TABELA 14 – Resultado histopatológico dos carcinomas endometriais no grupo de estudo

HISTOPATOLOGIA	n	(%)
• DIFERENCIAÇÃO ESCAMOSA		
- PRESENTE	09	(18)
- AUSENTE	41	(82)
• TIPO HISTOLÓGICO		
- ENDOMETRIÓIDE	37	(74)
- ADENOESCAMOSO	09	(18)
- POUCO DIFERENCIADO	01	(02)
- SEROSO	01	(02)
- DE CÉLULAS CLARAS	01	(02)
- MISTO	01	(02)
• GRAU DIFERENCIAÇÃO		
- NUCLEAR		
* I	25	(50)
* II	21	(42)
* III	04	(08)
- ARQUITETURAL		
* I	42	(84)
* II	04	(08)
* III	04	(08)

TABELA 15 – Indicação cirúrgica e resultado histopatológico do tecido endometrial do grupo controle

CARACTERÍSTICA	n	%
• ENDOMÉTRIO		
- TRÓFICO	31	(62)
- ATRÓFICO	19	(38)
• INDICAÇÃO CIRÚRGICA		
- MIOMATOSE	23	(46)
- PROLAPSO UTERINO	13	(26)
- CISTO DE OVÁRIO	06	(12)
- PÓLIPO ENDOMETRIAL	03	(06)
- METRORRAGIA	03	(06)
- ADENOMIOSE	02	(04)

5.2- Associação da presença do HPV com o câncer do endométrio

O risco relativo estimado (OR) da presença do HPV neste estudo, nas amostras de tecido endometrial, foi o mesmo nas mulheres portadoras de carcinoma endometrial, comparadas às amostras histológicas de mulheres sem câncer (tabela 16).

TABELA 16 – Risco relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV, segundo o diagnóstico histológico do endométrio

HPV	<u>Histologia Endometrial</u>				OR	(95% IC)	p *
	Carcinoma		Normal				
	n	%	n	%			
NEGATIVO	46	92	45	90	1,0		
POSITIVO	04	08	05	10	0,78	(0,16-3,66)	NS
TOTAL	50	100	50	100			

* Teste exato de Fisher (p=0,500)

5.3- Interferência da idade na associação entre a presença do HPV e o câncer de endométrio

Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com ou sem carcinoma de endométrio com idade igual ou inferior a 50 anos (tabela 17).

TABELA 17 – Risco relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV, segundo o diagnóstico histológico do endométrio em mulheres ≤ 50 anos

HPV	<u>Histologia Endometrial</u>				OR	(95% IC)	p*
	Carcinoma		Normal				
	n	%	n	%			
NEGATIVO	12	92	19	95	1,0		
POSITIVO	01	08	01	05	1,58	(0,6-5,41)	NS
TOTAL	13	100	20	100			

* Teste exato de Fisher (p=0,640)

Estudando as mulheres com mais de 50 anos, observamos que o risco relativo estimado (OR) da presença do HPV foi menor nas portadoras de carcinoma de endométrio que normais, porém não resultando em diferença estatisticamente significativa (tabela 18).

TABELA 18 – Risco relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV, segundo diagnóstico histológico do endométrio em mulheres > 50 anos

HPV	<u>Histologia Endometrial</u>				OR	(95% IC)	p*
	<u>Carcinoma</u>		<u>Normal</u>				
	n	%	n	%			
NEGATIVO	34	92	26	87	1,0		
POSITIVO	03	08	04	13	0,57	(0,09-3,42)	NS
TOTAL	37	100	30	100			

* Teste exato de Fisher (p=0,381)

5.4- Associação entre idade e presença do HPV em tecido endometrial

Considerando apenas as mulheres com carcinoma de endométrio verificou-se que a presença do HPV na amostra histológica foi a mesma entre as mulheres com idade ≤ 50 anos e as com maior idade (tabela 19).

TABELA 19 – Percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com carcinoma de endométrio, em relação a idade

HPV	<u>Idade</u>				p*
	≤ 50 anos		> 50 anos		
	n	%	n	%	
Negativo	12	92	34	92	NS
Positivo	01	08	03	08	
TOTAL	13	100	37	100	

* Teste exato de Fisher (p=0,725)

Nas mulheres sem carcinoma, a presença do HPV foi 2,5 vezes maior nas com idade superior a 50 anos, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa (tabela 20).

TABELA 20 – Percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres sem carcinoma de endométrio, em relação a idade

HPV	<u>Idade</u>				p*
	≤ 50 anos		> 50 anos		
	n	%	n	%	
Negativo	19	95	26	87	NS
Positivo	01	05	04	13	
TOTAL	20	100	30	100	

* Teste exato de Fisher (p=0,325)

5.5 Interferência do hábito de fumar na presença do HPV em tecido endometrial

O risco relativo estimado da presença do HPV foi 5 vezes menor nas amostras de endométrio das mulheres com câncer que entre as sem câncer, considerando apenas as mulheres fumantes. Esse menor risco, entretanto, não chegou a atingir significação estatística (tabela 21).

TABELA 21 – Risco relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV nas mulheres fumantes, segundo o diagnóstico histológico endometrial

HPV	<u>Histologia Endometrial</u>				OR	(95% IC)	p*
	Carcinoma		Normal				
	n	%	n	%			
NEGATIVO	14	93	06	75	1,0		
POSITIVO	01	07	02	25	0,21	(0,01- 4,06)	NS
TOTAL	15	100	08	100			

* Teste exato de Fisher (p=0,268)

No caso das mulheres não fumantes, o risco relativo estimado da presença do HPV foi praticamente o mesmo nas amostras de tecido das mulheres com carcinoma endometrial e nas amostras de tecido sem câncer (tabela 22).

TABELA 22 – Risco relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV nas mulheres não fumantes, segundo o diagnóstico histológico endometrial

HPV	<u>Histologia Endometrial</u>				OR	(95% IC)	p*
	Carcinoma		Normal				
	n	%	n	%			
NEGATIVO	32	91	39	93	1,0		
POSITIVO	03	09	03	07	1,22	(0,18-8,28)	NS
TOTAL	35	100	42	100			

* Teste exato de Fisher (p=0,571)

Analisando apenas o grupo das portadoras de carcinoma endometrial, observamos que a presença do HPV foi muito semelhante nas mulheres fumantes e nas não fumantes (tabela 23).

TABELA 23 – Percentual de mulheres com carcinoma endometrial, segundo a presença do HPV e tabagismo

HPV	<u>Fumo</u>				p*
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
NEGATIVO	14	93	32	91	NS
POSITIVO	01	07	03	09	
TOTAL	15	100	35	100	

* Teste exato de Fisher (p=0,653)

No grupo das mulheres sem carcinoma, apesar da presença do HPV ter sido 3,5 vezes maior nas fumantes, esta diferença não foi estatisticamente significativa (tabela 24).

TABELA 24 – Percentual de mulheres sem carcinoma endometrial, segundo a presença do HPV e tabagismo

HPV	<u>Fumo</u>				p*
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
NEGATIVO	06	75	39	93	NS
POSITIVO	02	25	03	07	
TOTAL	08	100	42	100	

* Teste exato de Fisher (p=0,175)

5.6- Associação entre a diferenciação escamosa e a presença do HPV em tecido endometrial com câncer

A porcentagem de amostras de tecido endometrial com HPV nos casos de carcinoma endometrial foi praticamente a mesma na presença e ausência de diferenciação escamosa. Este resultado não foi estatisticamente significativo (tabela 25).

TABELA 25 – Percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com carcinoma endometrial com e sem diferenciação escamosa

HPV	<u>Diferenciação Escamosa</u>				p*
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
NEGATIVO	08	89	37	90	NS
POSITIVO	01	11	04	10	
TOTAL	09	100	41	100	

* Teste exato de Fisher ($p=0,646$)

5.7- Associação entre o grau de diferenciação tumoral e a presença do HPV em tecido endometrial com câncer

Não observamos diferença quanto à presença do HPV quando avaliamos o grau nuclear (tabela 26) ou arquitetural (tabela 27) nas mulheres com carcinoma endometrial.

TABELA 26 – Percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com carcinoma, segundo o grau de diferenciação nuclear

HPV	<u>Grau Nuclear</u>				p*
	I		II/III		
	n	%	n	%	
NEGATIVO	23	92	23	92	NS
POSITIVO	02	08	02	08	
TOTAL	25	100	25	100	

* Teste exato de Fisher ($p=1,000$)

TABELA 27 – Percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com carcinoma, segundo o grau de diferenciação arquitetural

HPV	<u>Grau Arquitetural</u>				p*
	I		II/III		
	n	%	n	%	
NEGATIVO	39	93	07	88	NS
POSITIVO	03	07	01	12	
TOTAL	42	100	08	100	

* Teste exato de Fisher (p=0,513)

5.8- Associação entre o trofismo endometrial e a presença do HPV em tecido endometrial normal

Nas mulheres sem carcinoma endometrial em que o HPV foi identificado, não observamos diferença estatística quando comparamos o trofismo endometrial (tabela 28).

TABELA 28 – Percentual da presença do HPV em tecido endometrial normal, segundo o trofismo

HPV	<u>Trofismo Endometrial</u>				p*
	<i>Atrófico</i>		<i>Trófico</i>		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
NEGATIVO	16	94	29	88	NS
POSITIVO	01	06	04	12	
TOTAL	17	100	33	100	

* Teste exato de Fisher (p=0,440)

5.9- Tipos de HPV encontrados no tecido endometrial normal e com câncer

Analisando o tipo de HPV identificado nas amostras, observamos que o 16 foi o mais encontrado. Entretanto, o 18 isolado foi encontrado apenas em tecido endometrial normal (tabela 29).

TABELA 29 – Risco relativo estimado (Odds Ratio) da presença do HPV em tecido endometrial, segundo o diagnóstico histológico e tipo viral

HPV	<u>Histologia Endometrial</u>				OR	(95% IC)	p*
	Carcinoma		Normal				
	n	%	n	%			
NENHUM	46	92	45	90	1,0		
16	03	06	02	04	1,47	(0,19-13,29)	NS (p=0,519)
18	0	0	03	06	-		NS (p=0,129)
31 + 18	01	02	0	0	-		NS (p=0,510)
TOTAL	50	100	50	100			

* Teste exato de Fisher

6 DISCUSSÃO

O papel dos HPV de alto risco, principalmente o 16 e 18, no carcinoma do colo uterino tem sido bem documentado, mas sua contribuição na carcinogênese de outras neoplasias ainda foi pouco estudada e é controversa.

Os resultados deste estudo mostraram que o HPV esteve presente no tecido endometrial de mulheres com carcinoma de endométrio em percentual muito semelhante ao encontrado em tecido endometrial normal. O risco relativo estimado da presença do HPV no tecido endometrial de mulheres com carcinoma foi de 0,78.

Nesta casuística, 8% dos casos de carcinoma endometrial apresentaram DNA HPV. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Fujita e cols, 1996, que apesar de terem avaliado um número pequeno de casos encontraram um percentual de 7%. Outros trabalhos, no entanto, encontraram índices bem maiores de positividade, com percentuais variando de 24 a 40% (Lais e cols, 1992; Fujita e cols, 1995; Zimna e cols, 1997; Lininger e cols, 1998; O'Leary e cols, 1998; Semczuk e cols, 2000).

Mas, a grande maioria dos estudos não tem demonstrado a presença do HPV nos carcinomas endometriais (Ostrow e cols, 1987; Bergeron e cols, 1988; Wilezynski e cols, 1988; Nielsen, 1990; Im e cols, 1995; Hachisuga e cols, 1996; Hording e cols, 1997). Um resumo do percentual da presença do HPV em tecido endometrial normal e com carcinoma pode ser visto na tabela 30.

A identificação do DNA HPV no trato genital superior (em alterações benignas e malignas) não é incomum e seu significado ainda é incerto (Tsunokawa e cols, 1986; Bergerson e cols, 1988; Lai e cols, 1992; Milde-Langosch e cols, 1993; Wong e cols, 1993; Fugita e cols, 1995; Tsao e cols, 1995; Sworn e cols, 1995; Trottier e cols, 1995).

A especificidade tecidual de infecção dos HPV, aparentemente exclusiva para o epitélio pavimentoso da pele e das mucosas, tem sido contestada nos últimos anos, pois vários trabalhos mostram a capacidade do HPV infectar sítios diferentes. Tseng e cols em 1992 demonstraram a presença do HPV no líquido amniótico de mulheres grávidas e Hermonat e cols em 1998 no sinciciotrofoblasto de abortos espontâneos. Estes achados evidenciam a capacidade do vírus infectar a cavidade uterina também, pelo que não deve surpreender o achado do vírus no endométrio.

Tabela 30: Prevalência do DNA HPV em tecido endometrial normal e com carcinoma, de acordo com as Técnicas de detecção viral utilizadas.

<i>Autor</i>	<i>Ano</i>	<i>Técnica</i>	<i>HPV no Endométrio (%)</i>	
			<i>Normal</i>	<i>Câncer</i>
Ostrow e cols	1987	HSb	0	0
Bergeron e cols	1988	HSb	0	0
Wilezynski e cols	1988	HSb	0	0
Nielsen	1990	HSb	0	0
Milde-Langosch	1991	PCR	NA	37,5
Lai e cols	1992	PCR	70	37,5
Wong e cols	1993	PCR	4,5	NA
Fujita e cols	1995	PCR	13	NA
Fujita e cols	1996	PCR	NA	7
Hachisuga e cols	1996	PCR	NA	0
Zimna e cols	1997	PCR	NA	30
Hording e cols	1997	PCR	NA	0
Lininger e cols	1998	PCR	NA	25
O'Leary e cols	1998	PCR	0	35
Semczuk e cols	2000	PCR	NA	24
Fedrizzi e cols	2003	PCR	10	8
TOTAL			19,5	54,1

Obs: NA: não avaliado.

Nesta amostra encontramos a presença do DNA HPV em 10% das mulheres com endométrio normal, sendo 2 vezes mais freqüente nos endométrios tróficos (12%) que atróficos (6%). A grande maioria dos autores, entretanto, não encontraram o DNA viral nestes casos (Ostrow e cols, 1987; Bergeron e cols, 1988; Wilezynski e cols, 1988; Nielsen, 1990; O'Leary e cols, 1998). Exceção é o trabalho de Lai e cols, 1992 que encontraram DNA HPV em 70% dos casos de endométrio normal ou com alguma patologia benigna. O conceito de que o processo oncogênico do HPV esteja limitado ao trato genital inferior já não tem mais sustentação, pois também pode estar relacionado a tumores em localizações diferentes do trato genital e fora dele. Na década de 80 tivemos um relato de que os gens HPV E6 e E7 apresentavam habilidade para transformar células epiteliais superficiais do ovário humano, sugerindo que o HPV seja capaz de induzir neoplasia no trato genital feminino alto (de-Villiers e cols, 1986). Além disso, vários estudos tem mostrado a associação deste vírus com neoplasias malignas extragenitais como a boca (Saito e cols, 1999), laringe (Caruso & Valentim, 1997), esôfago (Morgan e cols, 1997), intestino (Cobb, 1990), pulmão (Tshako e cols, 1998), rim (Kuamara e cols, 1998), conjuntiva e saco lacrimal (Nakamura e cols, 1997), entre outros.

O adenocarcinoma de endométrio é tipicamente uma doença da mulher na pós-menopausa com aproximadamente 85% das pacientes estando acima dos 50 anos de idade (Cavanagh e cols, 1999). Apesar da incidência do adenocarcinoma de endométrio ter

aumentado nos últimos anos, esta doença continua incomum nas pacientes na pré-menopausa (Parslov e cols, 2000). Em mulheres jovens é geralmente associado a estadios inicial, bem diferenciado e de bom prognóstico. Se mulheres jovens com um risco aumentado para o desenvolvimento do carcinoma endometrial pudessem ser identificadas e acompanhadas ou tratadas precocemente teríamos uma modificação no prognóstico e incidência desta doença. Porém, os fatores de risco clássicos para o carcinoma endometrial não são encontrados nestas mulheres (Parslov e cols, 2000; Jeffery e cols, 1987). Parslov em 2000, analisando 237 mulheres com carcinoma endometrial e 538 controles observou que apenas o fator predisposição familiar foi significativo, com OR 2,1 (95% IC 1,1-3,8). Jeffery e cols em 1987, observaram que 32% das mulheres com carcinoma endometrial abaixo de 45 anos apresentavam endométrio normal e funcional. Daí a importância de se verificar se a infecção pelo HPV poderia ser um fator de risco neste grupo etário. Caso o HPV realmente esteja associado com esta neoplasia, a imunização pela vacina, atualmente em fase de testes, diminuiria significativamente o número de carcinoma endometrial nos próximos anos nestas pacientes.

Não encontramos diferença na presença do DNA HPV de acordo com a idade das mulheres avaliadas. O percentual de positividade foi de 8% tanto no grupo com idade igual ou inferior a 50 anos, quanto no de idade superior a 50. Estratificamos a amostra nestas 2 faixas para melhor avaliar os riscos da neoplasia endometrial em mulheres na pré e pós-menopausa, uma vez que a idade média da mulher brasileira apresentar a menopausa é em torno dos 50 anos (Ferreira, 1999). Um fator importante a ser considerado é a diferença na faixa etária dos grupos, pois, no grupo controle tivemos quase o dobro de mulheres com idade inferior ou igual a 50 anos (42% vs 24%), podendo isto ter interferido nos resultados. Apesar de que nas mulheres sem carcinoma o HPV foi 2,5 vezes mais encontrado na faixa etária superior aos 50 anos, este achado, entretanto, não foi estatisticamente significativo.

O fumo tem sido considerado um forte fator no desenvolvimento da associação entre a infecção HPV e a evolução das lesões pré-cancerosas no colo uterino. Também tem sido associado com um aumento no risco de câncer em vários locais do nosso organismo e em especial para a mulher nos órgãos genitais (vulva, vagina e colo). A nicotina e cotinina, além de outros metabólitos do fumo, teriam a capacidade de levar a uma diminuição das células de Langhans no trato genital inferior, responsável por uma diminuição da resposta imunológica, principalmente frente às infecções virais, como o HPV. Entretanto, tem-se discutido um possível efeito protetor do tabagismo no desenvolvimento do câncer endometrial. A nicotina diminui o nível de estrógeno por uma inibição enzimática (aromatase) e o hábito de fumar parece reduzir a idade da menopausa em algumas mulheres (Willett e cols, 1983). Vários estudos sugerem um risco diminuído de câncer endometrial em mulheres tabagistas (Weiss e cols, 1980; Lesko e cols, 1985; Baron e cols, 1986; Zemla e cols, 1986; Frank e cols, 1987; Lawrence e cols, 1987; Levi e cols, 1987; Koumantaki e cols, 1989; Paganini-Hill e cols, 1989).

Nós procuramos identificar alguma diferença quanto a presença do DNA HPV no tecido endometrial e o hábito de fumar. Avaliando apenas as mulheres fumantes, apesar de encontrarmos um risco relativo estimado (OR) da presença do HPV no endométrio com câncer 5 vezes menor do que nas mulheres com endométrio normal, esta diferença não foi estatisticamente significativa. A aparente dificuldade do HPV se instalar em um endométrio neoplásico em mulheres fumantes desaparece quando comparamos a presença do vírus em mulheres com câncer endometrial fumantes e não fumantes (7% e 9%, respectivamente). É

interessante porém, encontramos 3,5 vezes mais o DNA HPV em tecido endometrial normal em mulheres tabagistas, apesar desta diferença não ter sido significativa.

Stockwell & Lyman em 1987 observaram que quando as mulheres com carcinoma endometrial foram subdivididas por idade houve uma diferença no fator proteção. Mulheres com idade inferior a 50 anos não apresentaram evidência da associação do fumo e risco de câncer, enquanto que as com maior idade tiveram clara evidência da diminuição do risco com o aumento do número de cigarros fumados por dia (mais de 40 cigarros/dia reduziu em 60% a chance de ter câncer endometrial, quando comparado às não-fumantes). O mesmo resultado foi obtido por Smith e cols em 1984, que mostraram que o tabagismo aumentava o risco em mulheres na pré-menopausa e diminuía na pós-menopausa em relação à incidência do carcinoma endometrial.

O papel do HPV na patogênese de lesões pré-invasivas e invasivas do colo uterino tem sido extensivamente investigada e seu papel como agente etiológico está bem estabelecido (zur Hausen, 1986; Park e cols, 1995; Schiffman e cols, 1993; Lorincz e cols, 1992; Yee e cols, 1985; Sebbelov e cols, 1983). Vários tipos de HPV, especialmente os 16 e 18 tem sido associado ao carcinoma epidermóide invasor do colo uterino. Recentemente o DNA HPV tem também sido demonstrado nos adenocarcinomas cervicais (Leminen e cols, 1991; Milde-Langosch e cols, 1993; Duggan e cols, 1993; Matsuo e cols, 1993). A positividade do HPV nos adenocarcinomas endocervicais varia de 15 a 85%, com uma média de 57% (Duggan e cols, 1993). O HPV 16 é o tipo predominante nos casos de carcinoma epidermóide ou adenoescamoso, enquanto o HPV 18 prevalece no adenocarcinoma cervical (Duggan e cols, 1993). Todos os tipos de HPV isolados nos estudos que avaliaram a presença do vírus no carcinoma de endométrio e neste estudo foram os de risco oncogênico (principalmente o 16 e 18). Encontramos mais freqüentemente o HPV 16 nos casos de carcinoma (75%) e o HPV 18 nos endométrios normais (60%). O HPV 31 esteve associado ao 18 em apenas um caso de câncer. Entretanto, Czerwenk e cols em 1996 detectaram alguns casos de HPV de baixo risco (6 e 11) em seu estudo.

Os adenocarcinomas endometriais freqüentemente apresentam focos de diferenciação escamosa benigna (adenoacantomas) ou maligna (carcinomas adenoescamosos). A origem deste epitélio ainda é desconhecida, mas O'Leary e cols, 1998, acreditam que o HPV possa estar envolvido na gênese destes tecidos. Os autores encontraram uma aparente associação dos HPV de baixo risco (6 e 11) e metaplasia escamosa endometrial, encontrando HPV 6 em 22% dos casos de adenoacantomas e questionam a possível interação do HPV na patogenia da metaplasia escamosa extra-cervical. Em nosso estudo avaliamos esta possível associação mas não encontramos diferença, pois o HPV esteve presente em 11% dos casos com diferenciação escamosa e em 10% nos sem diferenciação e todos os HPVs isolados foram os de alto risco oncogênico. É possível que alguns casos de diferenciação escamosa não tenham sido identificados neste trabalho pela dificuldade de se avaliar o tumor em toda a sua extensão, uma vez que apenas alguns cortes de tecido neoplásico são avaliados.

A diferença de percentual da presença do HPV no carcinoma endometrial encontrado nos diversos trabalhos pode ser devido à metodologia utilizada ou mesmo ao processamento do espécime para estudo. A amostra da maioria dos estudos foi com poucos casos e muitas vezes compararam adenocarcinoma de colo e endométrio com critérios mal definidos na sua diferenciação. As populações foram bastante distintas com prevalências distintas também da infecção pelo HPV. Devemos considerar a possibilidade de vários

pesquisadores não terem detectado a presença do HPV talvez por utilizarem técnicas menos sensíveis, como a Hibridização Dot blot ou Southern blot.

O PCR é a técnica mais sensível para a detecção do DNA HPV. Porém, o DNA extraído de tecido embebido em parafina é geralmente fragmentado ou danificado, impedindo, muitas vezes, sua correta identificação (Matsuo e cols, 1993). Também devemos considerar que podem haver resultados falso positivos, principalmente em função de contaminação que não é raro pela técnica de PCR. Talvez isto possa ter ocorrido com Lai e cols que encontraram um percentual bastante elevado da presença do HPV tanto em tecido endometrial normal como com carcinoma.

Vários fatores podem interferir nos diferentes índices de positividade do HPV nos estudos anteriores, como a escolha do método de detecção, diferentes fatores de risco não avaliados (fumo, número de parceiros sexuais, baixo nível sócio-econômico, interação com outras DST) e o próprio delineamento do estudo.

Após a revisão da literatura, acreditamos que este seja o primeiro estudo tipo caso controle que inclui um número de pacientes com poder estatístico suficiente para análise. O tamanho da amostra necessária para um poder estatístico de 80% com um intervalo de confiança de 95% levando em consideração a positividade HPV para o grupo de casos de 25% e grupo controle de 3% calculado demonstrou a necessidade 92 casos (46 doentes e 46 sadios), satisfazendo as necessidades para análise. Até o momento encontramos apenas um trabalho na literatura que compara a presença do HPV em tecido endometrial normal com carcinoma, porém com um grupo controle muito pequeno de 10 casos, todos HPVs negativos (O'Leary e cols, 1998). Várias limitações metodológicas dificultam a avaliação de um número maior de casos, tanto pela doença não ser tão freqüente, quanto às dificuldades em selecionar mulheres com características semelhantes e o alto custo do exame de PCR. Esperávamos encontrar um número maior de casos positivos para o HPV no endométrio de mulheres portadoras de carcinoma, mas provavelmente fatores como uma avaliação de grupos muito heterogêneos (diversos tipos histológicos, mulheres com distintas faixas etárias, peso e alterações hormonais) possa ter interferido nos resultados. É possível que tenhamos algum resultado diferente se avaliarmos grupos de mulheres com características semelhantes, como por exemplo, amostras de um só tipo de neoplasia, determinadas populações ou como ocorre no câncer de colo uterino, mulheres com alguns cofatores específicos.

Definitivamente o HPV está presente no tecido endometrial e a maioria dos estudos demonstram que o de alto risco é o mais prevalente. Qual o seu verdadeiro papel neste local ainda desconhecemos. Caso novos trabalhos demonstrem uma estreita correlação do HPV e o carcinoma endometrial teremos modificações importantes no acompanhamento das mulheres portadoras desta infecção, assim como uma mudança na forma de screening desta neoplasia. O advento atual de novas e eficazes drogas antivirais como o interferon recombinante e a vacina anti-HPV poderiam modificar substancialmente o tratamento e número de casos de carcinoma endometrial no futuro.

Até o momento todos os trabalhos de carcinoma de endométrio se referem ao desequilíbrio hormonal feminino, com predomínio da ação estrogênica, como sendo responsável pela oncogênese. Entretanto, esta hipótese não explica todos os casos, principalmente os que ocorrem em pacientes mais jovens, sem os fatores de risco conhecidos. Nem mesmo as novas teorias isoladas das alterações nos gens *PTEN*, *ras* e *p53* explicam todos os casos. Estas alterações nos gens supressores tumorais estão associadas a outros fatores que desconhecemos até o momento e que talvez o HPV possa ser um dos

envolvidos. A relação causal entre o HPV e o carcinoma endometrial necessita mais estudos, incluindo um que satisfaça o “Postulado de Koch” no qual um agente etiológico isolado e desenvolvido em cultura seja capaz de reproduzir a doença se inoculado em cobaias experimentais (Kreider e cols, 1985) e os “Critérios de Bradford-Hill” para inferência causal (Franco, 1996).

Concluindo, nossos resultados mostram que a hipótese do HPV estar envolvido na gênese de alguns casos de carcinoma endometrial não se confirmou. Existem porém, vários fatores clínicos, biológicos, epidemiológicos e genéticos que nos levam a pensar na possibilidade do HPV também estar relacionado com as lesões pré e invasivas do endométrio, justificando estudos maiores, ou sejam:

- (1) Os fatores de risco do adenocarcinoma do colo uterino, cujo HPV 16 e 18 são frequentemente isolados, são semelhantes ao do endométrio.
- (2) Os adenocarcinomas endometriais frequentemente apresentam padrão escamoso associado (metaplasia escamosa ou carcinoma epidermóide), e é sabido o tropismo do HPV 16 a este tipo de epitélio.
- (3) Capacidade do HPV infectar o epitélio glandular. A correlação do HPV (16, 18, 33), está atualmente bem definida também nas lesões glandulares do colo uterino (adenocarcinoma “in situ” e invasoras).
- (4) Presença do HPV no líquido amniótico de pacientes grávidas, fora do trabalho de parto, comprovando a capacidade do HPV também se localizar na cavidade uterina.
- (5) Presença do HPV em outras neoplasias, distantes da área genital, como orofaringe, traquéia, pulmão, esôfago, intestino, rins, conjuntiva e saco lacrimal.
- (6) Consenso que existem dois tipos de carcinoma endometrial, um hormônio-dependente (estrógeno) e outro não hormônio-dependente cujo mecanismo oncogênico ainda é pouco conhecido e está associado a alterações nos gens supressores tumorais.
- (7) Os gens E₆ e E₇ dos HPV de alto risco atuam sobre os gens supressores tumorais p53 e pRb no colo uterino. A expressão exagerada e a mutação de p53 são ambos frequentemente encontrados no carcinoma endometrial.
- (8) O carcinoma de vulva também apresenta dois tipos distintos de tumores (Buckley e cols em 1984), os relacionados à infecção HPV e mais frequente em pacientes jovens (Tipo Bowenóide) e o não relacionado à infecção HPV e acometendo mais pacientes idosas (Tipo Basalóide), podendo esta associação também estar presente no carcinoma endometrial.
- (9) Tem-se tratado pacientes mais jovens de carcinoma endometrial nos últimos anos e também tem se observado um aumento da infecção HPV nas mulheres.
- (10) Trabalhos restritos e recentes na literatura demonstrando casos de carcinoma endometrial associados à presença do vírus HPV.

Acreditamos, portanto, que o Papilomavírus humano possa ser o responsável pelo menos por alguma fase da carcinogênese de alguns tipos de carcinoma endometrial que não estão associados ao perfil hiperestrínico. Esperamos que novos estudos sejam realizados neste sentido, conhecendo melhor a história natural do carcinoma endometrial, esclarecendo o real papel do HPV no endométrio, permitindo melhorar nossa capacidade diagnóstica e manejar de forma mais adequada estas mulheres.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- 1) O HPV foi detectado tanto no tecido endometrial normal quanto no carcinomatoso.
- 2) O percentual da presença do HPV em tecido endometrial de mulheres com e sem carcinoma endometrial não demonstrou diferença estatisticamente significativa.
- 3) Não houve diferença quanto ao tipo viral encontrado no tecido endometrial de mulheres com e sem carcinoma.
- 4) Os tipos de HPV detectados no tecido endometrial com câncer foram o 18 (6%) e sua associação com o 31 (2%) e no tecido normal o 16 (4%) e 18 (6%).
- 5) A ausência de associação entre a presença do HPV e o carcinoma endometrial foi independente da idade da mulher e do hábito do tabagismo.
- 6) Não foi observado associação da detecção do HPV com a presença de diferenciação escamosa e o grau de diferenciação do carcinoma endometrial.
- 7) Não houve diferença na presença do HPV em tecido endometrial normal quanto ao seu tropismo.

ANEXO 1

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

1) DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nº do prontuário: Nº de identificação na pesquisa:

Iniciais do Nome: Nascimento:/...../.....

Data Cirurgia:/...../..... Indicação:

Fumante: () Não () Sim → Quanto tempo: anos

Fone: Nº Cigarros: /dia

Médico Responsável:

2) HISTOLOGIA DA PEÇA CIRÚRGICA

Serviço de Anatomia Patológica:

Patologista Responsável:

• Grupo I

() Carcinoma de Endométrio

Tipo Histológico

() **COM componente Escamoso**

() Adenoacantoma

() Carcinoma Adenoescamoso

() Carcinoma Epidermóide

Grau Histológico

() I

() II

() III

() **SEM componente Escamoso**

() Adenocarcinoma Endometrióide

() Adenocarcinoma Seroso Papilífero

() Adenocarcinoma de Claras

() Sarcoma

Grau Citológico

() I

() II

() III

• Grupo II

() Endométrio Normal

() Trófico

() Atrófico

3) PESQUISA DO HPV POR PCR

() Negativo

() Positivo → Tipo:

ANEXO 2

EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE MATERIAL PARAFINADO PROTOCOLO 1 (Pinto, 1999; Villa, 2001)

1) CORTES HISTOLÓGICOS

1. Limpar a superfície do micrótomo e lâmina com xileno e etanol antes de cortar cada bloco e trocar as luvas constantemente para evitar contaminação cruzada entre as amostras.
2. Obter cortes com 6 μm de cada bloco e com palitos de dentes estéreis, colocar dois cortes em cada tubo de polipropileno, do tipo *ependorf*, de 1,5 ml.
3. Um bloco de parafina contendo um tecido comprovadamente não infectado por HPV usado como controle negativo, intercalado a cada 6 blocos da amostra, para monitorar possível contaminação.
4. Após a obtenção dos cortes para extração do DNA, verificar a presença de tecido representativo do endométrio no bloco recortado. Para tanto, um corte subsequente do bloco deve ser obtido e corado por Hematoxilina e Eosina e observado ao microscópio óptico.

2) EXTRAÇÃO DO DNA HPV DO MATERIAL PARAFINADO

1. Colocar duas fatias de tecido emblocado em parafina de 12 μm cada em tubos tipo *ependorf* de 1,5 ml.
2. Adicionar 1000 μl de iso-octano.
3. Agitar em agitador do tipo “gangorra” durante no mínimo 15 minutos.
4. Centrifugar em microcentrífuga durante 3 minutos.
5. Remover o iso-octano por aspiração com bomba à vácuo.
6. Repetir os procedimentos 4 e 5 por mais três vezes.
7. Adicionar 500 μl de etanol 100% a cada tubo. Misturar por inversão durante 5 minutos à temperatura ambiente.
8. Centrifugar os tubos durante 3 minutos e remover o etanol por aspiração.
9. Repetir os procedimentos 7 e 8 por mais uma vez.
10. Secar as amostras em um dessecador acoplado a um sistema de vácuo durante no mínimo 15 minutos.
11. Adicionar de 50 a 200 μl da solução TEP (Tris 10 mM, EDTA 10 mM e proteinase K, concentração final 200 $\mu\text{g/ml}$). O volume varia de acordo com a quantidade de material presente nos tubos. Incubar por 48 horas a aproximadamente 55 °C.
12. Inativar a proteinase K por aquecimento a 95 °C durante 5 minutos.
13. Centrifugar por 1 minuto e transferir o sobrenadante para novo *ependorf*. Igualar o volume dos tubos adicionando TE (10 mM Tris-HCL, pH 7.4, 1 mM EDTA).

3) EXTRAÇÃO OU PURIFICAÇÃO ORGÂNICA

1. Após a digestão acrescentar fenol saturado (1 volume amostra : 1 volume fenol) e homogeneizar durante no mínimo 10 segundos em agitador de tubos do tipo *vortex*.
2. Acrescentar clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) (1 volume amostra : 1 volume clorofórmio) e agitar por no mínimo 10 segundos.
3. Centrifugar por 3 minutos.
4. Remover a fase aquosa (superior) e transferir para tubo limpo. Tomar cuidado em não remover proteínas e outros resíduos depositados na interface.
5. Adicionar clorofórmio : álcool isoamílico (1:1) e agitar por no mínimo 10 segundos.
6. Centrifugar por 5 minutos em microcentrífuga e transferir a fase aquosa para outro tubo limpo.

4) PRECIPITAÇÃO DO DNA

1. Adicionar à fase aquosa acetato de sódio 3 M, pH 6.0 (10% do volume da amostra – concentração final 0,3 M) e etanol 100%, gelado (2,5 x o volume da amostra – concentração final 70%). Misturar por inversão.
2. Incubar no freezer a -70°C , por no mínimo 1 hora.
3. Centrifugar por 20 minutos a baixa temperatura.
4. Aspirar o etanol com pipeta de vidro fina acoplada ao aspirador. Secar em bomba de vácuo.
5. Ressuspender em TE (10 mM Tris-HCL, pH 7.4, 1 mM EDTA – volume igual ao que existia na amostra na fase de digestão). Misturar em *vortex* por 2 minutos (mínimo 1 minuto).

ANEXO 3

EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE MATERIAL PARAFINADO PROTOCOLO 2 (Pinto, 1999; Villa, 2001)

1. Coletar em tubos tipo *eppendorf* de 1,5 ml, duas fatias de tecido emblocado em parafina, de 12 µm cada.
2. Adicionar 100 µl de solução TEP (Tris 10 mM, EDTA 10 mM e 200 µg/ml de proteinase K), e as amostras devem ser incubadas por 3 dias a 55°C.
3. Após a digestão, os tubos serão incubados a 95°C por 10 minutos para a inativação da proteinase residual e proteínas contaminantes.
4. Adicionar 455 µl de solução de NaI (kit GlassMAX, Gibco BRL, USA), e agitar vigorosamente por 20 segundos. Esta solução, além de sua propriedade ligante, tem a capacidade de dissolver a parafina.
5. Adicionar a solução DNA/NaI ao dispositivo com a coluna GlassMAX e centrifugar em microcentrífuga para tubos tipo *eppendorf* por 20 segundos.
6. O procedimento de lavagem deve ser realizado três vezes, com 400 µl de tampão de lavagem (fornecido no kit) a 4°C, seguido de centrifugação por 20 segundos cada vez.
7. Após a remoção do último tampão de lavagem dos tubos, centrifugar por 1 minuto.
8. O DNA aderido à coluna deve ser eluído pela adição de 40 µl de TE pré-incubado a 65°C e centrifugar por 20 segundos, após a troca do tubo que recolheu a solução de lavagem por um tubo tipo *eppendorf* de 1,5 ml limpo.

ANEXO 4

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

(Pinto, 1999; Villa, 2001)

A viabilidade do DNA foi testada por meio da amplificação de um segmento de gene da beta-globina. Para esta amplificação serão utilizados os *primers* PCO₃ e G74, que amplificam um fragmento do gene da beta-globina de 100 pb. A reação foi padronizada da seguinte forma:

primer: PCO₃: 5'-ACACAACTGTGTGTTCACTAGC-3'
G74: 3'-CAACTTCATCCACGTTTAC-5'

Concentrações dos reagentes (Perkin Elmer, New Jersey, USA):

50 mM KCl
10 mM TRIS-HCl (pH 8,5)
200 µM de cada dNTP
2,5 U de Taq Polimerase (Cembiot, RS, Brasil)
50 nM de cada *primer*
1,5 mM de Cloreto de Magnésio
Volume de DNA aplicado: 1, 3 ou 6 µl
Volume final por tubo: 50 µl

Número de ciclos: 40

Desnaturação: 95°C – 1 minuto

Anelamento: 55°C – 1 minuto

Extensão: 72°C – 2 minutos (último ciclo – 7 minutos)

Para amplificação de um fragmento de 109 pb do gene E6 do HPV 16, serão utilizados os *primers* H1/H2 . As condições utilizadas para a reação são as que seguem:

primers: H1: 5'-ATTAGTGAGTATAGACATTA-3'
H2: 3'-GGCTTTTGAGAGTTAATACA-5'

Concentrações dos reagentes (Perkin Elmer, New Jersey, USA):

50 mM KCl
10 mM TRIS_HCL (pH 8,5)
3 mM de Cloreto de Magnésio
200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
2 U de Taq Polimerase (Cembiot, RS, Brasil)
1 µM de cada *primer*

Volume de DNA aplicado: o mesmo aplicado na PCR para beta-globina.

Volume final por tubo: 50 µl

Número de ciclos: 35

Desnaturação: 95°C – 1 minuto

Anelamento: 40°C – 2 minutos

Extensão: 70°C – 1,5 minutos (último ciclo – 7 minutos)

Primers que amplificam uma região de 109 pb do gene E6 do HPV 18 são utilizados sob as mesmas condições das reações descritas anteriormente. Abaixo, a sequência de nucleotídeos que foi utilizada para esta amplificação:

primers: H1: 5'-ATTAGTGAGTATAGACATTA-3'

H3: 5'-GGTTTCTGGCACCGCAGGCA-3'

A determinação do tipo viral é realizada a partir da digestão dos produtos de PCR por enzimas de restrição Ddel, RsaI, BamHI, HinfI, HaeIII, PstI e Sau3AI.

Os produtos amplificados são analisados em géis de poliacrilamida a 7%, corados pela prata. Os protocolos de confecção do gel de acrilamida e coloração por impregnação argêntica estão descritos a seguir (anexo 5).

ANEXO 5

PROTOCOLOS DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR (Pinto, 1999; Villa, 2001)

1) CONFEÇÃO DO GEL DE ACRILAMIDA

Os produtos amplificados foram analisados em géis de poliacrilamida a 7%.

Solução Acril:Bisacrilamida 30% (29:1) – 3,5 ml

Água MilliQ – 9,9 ml

BTE 10 x pH 8.3 (Tris-Borato-EDTA) – 1,5 ml

APS 10% (Persulfato de Amônio) – 150 µl

TEMED 0,1% - 15 µl

Volume final para dois géis – 15 ml

O tampão de amostra utilizado é composto de azul de bromofenol e xilenocianol a 0,25% cada e ficoll 15%. O tampão da corrida é o BTE 1 x e voltagem utilizada variou de 50 a 10 V. Para a visualização dos resultados utilizou-se a técnica de impregnação argêntica.

2) COLORAÇÃO DO GEL DE ACRILAMIDA PELA PRATA

Fixador: Etanol 10% ; ácido acético 0,5%

Corante: Nitrato de Prata (AgNO_3) 0,2%

Revelador: NaOH 0,75 M e formaldeído 0,1 M

1. Colocar o gel no fixador por no mínimo 2 minutos agitando.
2. Adicionar o corante por 10 minutos sob agitação suave
3. Lavar instantaneamente com água MilliQ duas vezes.
4. Adicionar o revelador e agitar o tempo suficiente.
5. Colocar no fixador novamente.
6. Montar em placa de vidro envolto em celofane e deixar secar a temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRÃO MS, MARQUES JA. Câncer de endométrio : etiopatogenia, diagnóstico e estadiamento. In: Abrão FS. **Tratado de Oncologia Genital e Mamária**, São Paulo: Roca, 1995.
2. ADAMS M, BORYSIEWICZ L, FIANDER A, et al. Clinical studies of human papillomavirus vaccines in pre-invasive and invasive cancer. **Vaccine**, v. 19, p. 2549-2556, 2001.
3. AGLIANO AM, GRADILONE A, GAZZANIGA P, et al. High frequency of human papillomavirus detection in urinary bladder cancer. **Urol Int**, v. 53, p. 125-129, 1994.
4. ALLDERLING TJ, JORDAN SW, BOARDMAN RE. Association of human papillomavirus and chlamydia infection with incidence of cervical neoplasia. **Acta Cytologica**, v. 29, p. 653-660, 1985.
5. AMBROS RA, SHEEHAN CE, KALLAKURY BV, et al. MDM 2 and p53 protein expression in the histologic subtypes of endometrial carcinoma. **Mod Pathol**, v. 9, p. 1165-1169, 1996.
6. AMBROS RA, SHERMAN ME, ZAHN CM, et al. Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumor displaying serous differentiation. **Human Pathol**, v. 26, p. 1160-1167, 1995.
7. AMBROS RA, VIGNA PA, FIGGE J, et al. Observations on tumor and metastatic supresor gene status in endometrial carcinoma with particular emphasis on p53. **Cancer**, v. 73, p. 1686-1692, 1994.
8. ANCIAUX D, LAWRENCE WD, GREGOIRE L. Glandular lesions of the uterine cervix: Prognostic implications of Human Papillomavirus status. **Int J Gynecol Pathol**, v. 16, n. 2, p. 103-110, 1997.
9. ANTTILA T, SAIKKU P, KOSKELA P, et al. Serotypes of chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. **JAMA**, v. 285, p. 47-51, 2001.
10. ARENDS MJ, WYLLIE AH, BIRD CC. Papillomaviruses and human cancer. **Human Pathol**, v. 21, p. 686-698, 1990.

11. ATKIN NB, BAKER MC. Chromosome 1 in 26 carcinomas of the cervix uteri structural and numerical changes. **Cancer**, v. 44, p. 604-613, 1979
12. BACCHI CE, DE ALMEIDA PCC, FRANCO M. **Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos** – Sociedade Brasileira de Patologia. 2 ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores, 1999.
13. BAIN RP, GREENBERG S, CHIUNG KL. Racial differences in survival of women with endometrial cancer. **Am J Obstet Gynecol**, v. 157, p. 914-923, 1987.
14. BAKER CC, PHELPS WC, LINDCZEN V, et al. Structural and translational analysis of cervical carcinoma cells lines. **J Virol**, v. 61, p. 962-971, 1987.
15. BALLARD-BARBASH R, SCHATZKIN A, TAYLOR PR, KAHLE LL. Association of change in body mass with breast cancer. **Cancer Res**, v. 50, p. 2152-2155, 1990.
16. BARON JA, BYERS T, GREENBERG ER et al. Cigarette smoking in women with cancers of the breast and reproductive organs. **J Natl Cancer Inst**, v. 77, p. 677-680, 1986.
17. BARON JA, LA VECCHIA C, LEVI F. The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 162, p. 502-514, 1990.
18. BARRET RJ, HARLAN LC, WESLEY MN, et al. Endometrial cancer: stage at diagnosis and associated factors in black and white patients. **Am J Obstet Gynecol**, v. 173, p. 414-423, 1995.
19. BARTON SE, MADDEN PH, JENKIN J. The effect of smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change ? **Lancet**, v. ii, p. 652-654, 1988.
20. BASU J, PALAN PR, VERMUND SH, et al. Plasma ascorbic acid and beta-carotene levels in women evaluated for HPV infection, smoking and cervical dysplasia. **Cancer Det and Prev**, v. 15, p. 165-170, 1991.
21. BAUER HM, TING Y, GREER CE, et al. Genital human papillomaviruses infection in female university students as determined by a PCR-based method. **JAMA**, v. 265, p. 472-477, 1991.
22. BECKER MT, WHEELER MC, MC GROUGH NS, et al. Contraceptive and reproductive risks for cervical dysplasia in southwestern Hispanic and non Hispanic white women. **Int J Epidemiol**, v. 23, p. 913-917, 1994.
23. BERGERON C, SHAN K, DANIEL R, et al. Search for human papillomaviruses in normal hyperplastic and neoplastic endometria. **Obstet Gynecol**, v. 72, p. 383-387, 1988.

24. BERGMAN L, BEELEN MLR, GALLEE MPW, et al. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. **Lancet**, v. 356, p. 881-887, 2000.
25. BERNARD BA, BAILLY C, LENOIR M-C, et al. The human papillomavirus type 18 (HPV 18) E2 gene product is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes. **J Virol**, v. 63, p. 4317-4324, 1989.
26. BERNARD HU, CHAN SY, MANOS MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis**, v. 179, p. 1077-1085, 1994.
27. BERNARD HU. Gene expression of genital human papillomaviruses. **19th International Papillomavirus Conference - Annal**. O-35.
28. BOKHMAN JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol**, v. 15, p. 10-17, 1983.
29. BOSCH FX, MANOS MM, MUÑOZ N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer. A worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, p. 796-800, 1995.
30. BRACHMAN DG, GRAVES D, VOKES E, et al. Occurrence of p53 gene deletions and human papillomavirus infection in human head and neck cancer. **Cancer Res**, v. 52, p. 4832-4836, 1992.
31. BRAND E, BEREK JS, HACKER NF. Controversies in the management of cervical adenocarcinoma. **Obstet Gynecol**, v. 71, p. 261-269, 1988.
32. BRINTON LA, BERMAN ML, MORTEL R, et al. Reproductive, menstrual and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. **Am J Obstet Gynecol**, v. 167, p. 1317-1325, 1992.
33. BRINTON LA, HOOVER RN. Estrogen replacement therapy and endometrial cancer risk: unresolved issues. The Endometrial Cancer Collaborative Group. **Obstet Gynecol**, v. 81, p. 265-271, 1993.
34. BROCK KE, BERRY G, MOCH PA, et al. Nutrients in diet and plasma and risk of in situ cervical cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 80, p. 580-585, 1988.
35. BUKCLEY CH, BUTLER EB, FOX H. Vulvar intraepithelial neoplasia and microinvasive carcinoma of the vulva. **J Clin Pathol**, v. 37, p. 1201-1204, 1984.
36. BUR ME, PERLMAN C, EDELMAN L. p53 expression in neoplasms of the uterine corpus. **Am J Clin Pathol**, v. 98, p. 81-87, 1992.
37. CADUFF RF, JOHNSTON CM, FRANK TS. Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium. **Am J Pathol**, v. 146, p. 182-188, 1995.

38. CARMICHAEL PL, UGWUMADA AHN, NEVEN P, et al. Lack of genotoxicity of tamoxifen in human endometrium. **Cancer Res**, v. 56, p. 1475-1479, 1996.
39. CARTER JJ, GALLOWAY DA. Humoral immune response to human papillomavirus infection. **Clin Dermatol**, v. 15, p. 249-259, 1997.
40. CARTER JJ, MADELEINE MM, SHERA K, et al. Human papillomavirus 16 and 18 L1 serology compared across anogenital cancer sites. **Cancer Res**, v. 61, p. 1934-1940, 2001.
41. CARUSO ML, VALENTINI SM. Localization of p53 protein and human papillomavirus in laryngeal squamous lesions. **Anticancer Res**, v. 17, p. 4671-4676, 1997.
42. CARVALHO NS, DIAS WAB, SALLOUM SZ et al. New connection between sexually transmitted disease and cervical intraepithelial neoplasia. **Acta Obst Gynecol Scand**, v. 76, p. 65-66, 1997.
43. CATABUS L, MACHIN P, MATIAS-GUIU X, PRAT J. Microsatellite instability in endometrial carcinoma: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. **Human Pathol**, v. 29, p. 1160-1164, 1998.
44. CAVANAGH D, FIORICA J, HOFFMAN MS, et al. Adenocarcinoma of the endometrium: an institutional review. **J M C C**, v. 6, n. 4, p. 354-360, 1999.
45. CESARINO ER, SARTORI MGF, GONÇALVES WJ. Adenocarcinoma de colo uterino – Epidemiologia e classificação. **GO**, v. 4, p. 83-87, 1999.
46. CHANG F, SYRJÄNEN S, SHEN Q, et al. Screening for human papillomavirus infections in esophageal squamous cell carcinomas by in situ hybridization. **Cancer**, v. 72, p. 2525-2530, 1993.
47. CHANG KW, CHANG C-S, LAI K-S, et al. High prevalence of human papillomavirus infection and possible association with betel quid chewing and smoking in oral epidermoid carcinoma in Taiwan. **J Med Virol**, v. 28, p. 57-61, 1989.
48. CHENG Y-W, CHION H-L, SHEN G-T, et al. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. **Cancer Res**, v. 61, p. 2799-2803, 2001.
49. COBB MW. Human Papillomavirus infection. **J Am Acad Dermatol**, v. 22, p. 547-552, 1990.
50. COHEN CJ, RAHAMAN J. Endometrial Cancer: Management of High Risk and Recurrence including the Tamoxifen Controversy. **Cancer**, v. 76, p. 2044-2052, 1995.

51. COX JT. Epidemiologia da neoplasia intraepithelial cervical: papel do papillomavirus humano. **CI Obstet Ginecol**, v. 1, p. 1-38, 1995.
52. CROOK T, WREDE D, TIDY JA, et al. Clonal p53 mutations in primary cervical cancer: association with human papillomavirus-negative tumours. **Lancet**, v. 339, p. 1070-1073, 1992.
53. CZERWENK K, LU Y, HEUSS F, MANAVI M, KUBISTA E. Human papillomavirus detection of endometrioid carcinoma with squamous differentiation of the uterine corpus. **Gynecol Oncol**, v. 61, p. 210-214, 1996.
54. DAHLGREN E, JOHANSSON S, ODEN A, LINDESTROM B, JANSON PO. A model for prediction of endometrial cancer. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 68, p. 507-510, 1989.
55. DALING JR, MADELEINE MM, MC NIGHT B, et al. The relationship of human papillomavirus-related cervical tumours to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. **Cancer Epid Biom & Prev**, v. 5, p. 541-548, 1996.
56. DE BRITTON RC, HILDESHEIM A, DE LAO S, et al. Human papillomavirus and other influences on survival from cervical cancer in Panama. **Obstet Gynecol**, v. 81, p. 19-24, 1993.
57. DE VILLIERS E-M, WAGNER D, SCHNEIDER A, et al. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. **Lancet**, v. ii, p. 703-706, 1982.
58. DEACON JM, EVANS CD, YULE R, et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN 3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. **Br J Cancer**, v. 88, n. 11, p. 1565-1572, 2000.
59. DELIGDISCH L, HOLINKA CF. Progesterone receptors in two groups of endometrial carcinoma. **Cancer**, v. 57, p. 1385-1388, 1986.
60. DE-VILLIERS EM, SCHNEIDER A, GROSS G, et al. Analysis of benign and malignant urogenital tumours for human papillomavirus infection by labeling cellular DNA. **Med Microbiol Immunol Berl**, v. 174, p. 281-286, 1986.
61. DUGGAN MA, BENOIT JL, MC GREGOR SE, et al. The human papillomavirus status of 114 endocervical adenocarcinoma cases by dot blot hybridization. **Human Pathol**, v. 24, p. 121-125, 1993.
62. DUGGAN MA, MC GREGOR SE, BENOIT JL, et al. The human papillomavirus status of invasive cervical adenocarcinoma: a clinicopathological and outcome analysis. **Human Pathol**, v. 26, p. 319-325, 1995.

63. EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. **Lancet**, v. 351, p. 1451-1467, 1998.
64. ELLENSON LH. International Society of Gynecological Pathologists Symposium on Endometrial Hyperplasia II. The molecular biology of endometrial tumorigenesis: does it have a message? **Int J Gynecol Pathol**, v. 19, n. 4, p. 310-313, 2000.
65. ELLERBROCK TU, CHIASSEON MA, BUSH TJ, et al. Incidência de lesões escamosas intraepiteliais cervicais em mulheres infectadas pelo HIV. **JAMA Brasil**, v. 4, n. 5, p. 3124-3138, 2000.
66. ELUF-NETO J, BOOTH M, MUÑOZ N, et al. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **Br J Cancer**, v. 69, p. 114-119, 1994.
67. ELWOOD JM, COLE P, ROTHMAN KJ, KAPLAN SD. Epidemiology of endometrial cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 59, p. 1055-1060, 1977.
68. EPPEL W, WORDA C, FRIGO P, et al. Human papillomavirus in the cervix and placenta. **Obstet Gynecol**, v. 96, p. 337-341, 2000.
69. ESCHELMAN JR, MARKOWITZ SD. Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. **Curr Opin Oncol**, v. 7, p. 83-89, 1995.
70. EWERZ M, SCHOU G, BOICE JD Jr. The joint effect of risk factors on endometrial cancer. **Eur J Clin Oncol**, v. 24, p. 189-194, 1988.
71. FAN BT, LU H, HU H, et al. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome C release and caspase activation. **J Exp Med**, v. 187, n. 4, p. 487-496, 1998.
72. FERENCY A, GELFAND M. The biologic significance of cytologic atypia in progestogen-treated endometrial hyperplasia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 160, p. 26-31, 1989.
73. FERGUSON AW, SUOBODA-NEWMAN SM, FRANK TS. Analysis of Human Papillomavirus infection and molecular alterations in adenocarcinoma of the cervix **JAMA**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 1988.
74. FERREIRA JAS. A perimenopausa. In: FERNANDES CE, DE MELO NR, WEHBA S. **Climatério Feminino: Fisiopatologia, Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Lemos Editorial, 1999.
75. FERRERA A, OLIVIO A, ALAEZ C, et al. HLA DQA1 and DQB1 loci in Honduran women with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma and their relationship to human papillomavirus infection. **Human Biol**, v. 71, n. 3, p. 767-779, 1999.

76. FRANCO EL. Epidemiologia das verrugas anogenitais e do câncer. In: LORINCZ AT, REID R. **Clin Obst Am Norte**, v. 3, p. 581-606, 1996.
77. FRANCO EL. Epidemiologia do câncer mamário e ginecológico. In: ABRÃO FS. **Tratado de Oncologia Genital e Mamária**, São Paulo: Editora Roca, 1995.
78. FRANKS AL, KENDRICK JS, TYLER CW et al. Postmenopausal smoking, estrogen replacement therapy and the risk of endometrial cancer. **Am J Obstet Gynecol**, v. 156, p. 20-23, 1987.
79. FRIZELLE FA, HOBDAK KS, BATTS KP, NELSON H. Adenosquamous and squamous carcinoma of the colon and upper rectum: a clinical and histopathologic study. **Dis colon Rectum**, v. 44, n. 3, p. 341-346, 2001.
80. FUJITA M, ENOMOTO T, WADA H, et al. Application of clonal analysis. Differential diagnosis for synchronous primary ovarian and endometrial cancers and metastatic cancer. **Am J Clin Pathol**, v. 105, n. 3, p. 350-359, 1996.
81. FUJITA M, SHROYER KR, MARKHAM NE, et al. Association of human papillomavirus with malignant and inemalignant lesions of the uterine endometrium. **Human Pathol**, v. 26, p. 650-658, 1995.
82. GALLOWAY DA, MC DOUGALL JK. The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a "hit and run" mechanism. **Nature**, v. 302, p. 21-24, 1983.
83. GALLUP DG, STOCK RJ. Adenocarcinoma of the endometrium in women 40 years of age or younger. **Obstet Gynecol**, v. 64, p. 417-420, 1984.
84. GAMBREL RD. Role of hormones in the etiology and prevention of endometrial and breast cancer. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 106, p. 37-46, 1982.
85. GEISLER HE, HUBER CP, ROGER S. Carcinoma of the endometrium in premenopausal women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 104, p. 657-663, 1969.
86. GITSCH G, HANZAL E, JENSEN D, HACKER NF. Endometrial cancer in premenopausal women 45 years and younger. **Obstet Gynecol**, v. 85, p. 504-508, 1995.
87. GONÇALVES W, RODRIGUES DE LIMA G. Neoplasia maligna do endométrio. **Revista Compacta**, v. 2, n. 3, p. 5-21, 2002.
88. GORBACH SL, GOLDIN BR. Diet and the excretion and enterohepatic cycling of estrogens. **Prev Med**, v. 16, p. 525-531, 1987.
89. GREENBLATT MS, BENNETT WP, HOLLSTEIN M, HARRIS CC. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res**, v. 54, p. 4855-4878, 1994.

90. GREENLE RJ, MURRAY T, BOLDEN S, WINGO PA. Cancer statistics 2000. **Cancer J Clin**, v. 50, p. 7-33, 2000.
91. GURIN CC, FEDERICI MG, KANG L, BOYD J. Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. **Cancer Res**, v. 59, p. 462-466, 1999.
92. HACHISUGA T, FUKUDA K, UCHIYAMA M, et al. Immunohistochemical study of p53 expression in endometrial carcinoma: correlation with markers of proliferating cells and clinicopathologic features. **Int J Gynecol Cancer**, v. 3, p. 363-368, 1993.
93. HACHISUGA T, MATSUO N, IWASAKA T, et al. Human papillomavirus and p53 overexpression in carcinomas of the uterine cervix, lower uterine segment and endometrium. **Pathology**, v. 28, p. 28-31, 1996.
94. HALBERT CL, DEMER SGW, GALLOWAY DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. **J Virol**, v. 65, p. 473-478, 1991.
95. HALPERT R, FRULTER RG, SEDLIS A, et al. Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. **Obstet Gynecol**, v. 68, p. 251-257, 1986.
96. HECK DV, YEE CL, HOWLEY PM, MUNGER K. Efficiency of binding the retinoblastome protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p. 4442-4446, 1992.
97. HENDERSON BE, CASAGRANDE JT, PIKE MC, MACK T, ROSARIO I, DUKE A. The epidemiology of endometrial cancer in young women. **Br J Cancer**, v. 47, p. 749-756, 1983.
98. HENDRICKSON MR, KEMPSON RL. Normal histology of the uterus and fallopian tubes. In STERNPERG SS. **Histology for Pathologist**. 2nd ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, p. 879-928, 1997.
99. HENDRICKSON MR, ROH J, EIFEL P, et al. Uterine papillary serous carcinoma: a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma. **Am J Surg Pathol**, v. 6, p. 93-108, 1982.
100. HERMONAT PL, KECHELAVA S, LOWERY CL, KOROVRIAN S. Trophoblasts are the preferential target for human papillomavirus infection in spontaneously aborted products of conception. **Human Pathol**, v. 29, p. 170-174, 1998.
101. HERRERO R, BRINTO LA, REEVES W, et al. Injectable contraceptives and risk of invasive cervical cancer: evidence of an association. **Int J Cancer**, v. 46, p. 5-8, 1990.

102. HERRINGTON CS. Human papillomaviruses and cervical neoplasia. I: classification, virology, pathology and epidemiology. **Clin Pathol**, v. 47, p. 1066-1072, 1994.
103. HICKS ML, KIM WS, ABRAM J, et al. Racial differences in surgically staged patients with endometrial cancer. **J Natl Med Assoc**, v. 89, p. 134-140, 1997.
104. HILL HA, ELEY JW, HARLAN LC, et al. Racial differences in endometrial cancer survival: the black/white cancer survival study. **Obstet Gynecol**, v. 88, p. 919-926, 1996.
105. HINDS PW, WEINBERG RA. Tumor suppressor genes. **Curr Opin Genet Devel**, v. 4, p. 135-141, 1994.
106. HISADA M, VAN DEN BERG BJ, STRICKLER C, et al. Prospective study of antibody to human papillomavirus type 16 and risk of cervical, endometrial and ovarian cancer (United States). **Cancer Causes Control**, v. 12, n. 4, p. 335-341, 2001.
107. HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, et al. p53 mutations in human cancer. **Science**, v. 253, p. 49-53, 1991.
108. HORDING U, DUGAARD S, VISFELD J. Adenocarcinoma of the cervix and adenocarcinoma of the endometrium: Distinction with PCR-mediated detection of HPV DNA. **APMIS**, v. 105, n. 4, p. 313-316, 1997.
109. HORDING U, TEGLBJAERG CS, VISFELDT J, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 in adenocarcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Oncol**, v. 46, p. 313-316, 1992.
110. HOWLEY PM. Role of the human papillomavirus in human cancer. **Cancer Res**, v. 51, n. Supl, p. 5019-5022, 1991.
111. HULKA BS, CHAMBLESS LE, KAUFMAN DG, et al. Protection against endometrial carcinoma by combination-product oral contraceptives. **JAMA**, v. 147, p. 475-477, 1982.
112. HULKA BS, FOWLER WC, KAUFMAN DG, et al. Estrogen and endometrial cancer: cases and two control groups from north Carolina. **Am J Obstet Gynecol**, v. 137, p. 92-101, 1980.
113. IM D, SHAH K, ROSENHEIN N. Report of three new cases of squamous carcinoma of the endometrium with emphasis on the HPV status. **Gynecol Oncol**, v. 56, p. 464-469, 1995.
114. IWASAWA A, KUMAMOTO Y, FUKUSHIMA M, et al. Presence of human papillomavirus 6/11 DNA in conicyloma acuminatum of the urinary bladder. **Urol Int**, v. 48, p. 235-238, 1992.

115. IWASAWA A, NIEMINEN P, LEHTINEN M, PAAVONEN J. Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. **Cancer**, v. 77, p. 2275-2279, 1996.
116. JEFFERY JD, TAYLOR R, ROBERTSON DI, STUART GCE. Endometrial carcinoma occurring in patients under the age of 45 years. **Am J Obstet Gynecol**, v. 156, p. 366-370, 1987.
117. JICK H, PORTER J, MORRISON AS. Relation between smoking and age at natural menopause. **Lancet**, v. 2, p. 1354-1355, 1977.
118. JICK SS, WALKER AM, JICK H. Oral contraceptives and endometrial cancer. **Obstet Gynecol**, v. 82, p. 931-935, 1993.
119. JIKO K, TSUDA H, SATO S, HIROHASHI S. Pathogenetic significance of p53 and c-k-ras mutations and human papillomavirus DNA integration in adenocarcinoma of the uterine cervix and uterine isthmus. **Int J Cancer**, v. 59, p. 601-606, 1994.
120. JONES CJ, SCHIFFMAN MH, KURMAN R, JACOB P, BENOWITZ NC. Elevated nicotine levels in cervical lavages from passive smokers. **Am J Public Health**, v. 81, p. 378-379, 1991.
121. KAKU T, MATSUO K, TSUKAMOTO N. Endometrial carcinoma in women aged 40 years or younger: a Japanese experience. **Int J Gynecol Cancer**, v. 3, p. 147-153, 1993.
122. KATAOKA A, NISHIDA T, SUGIYAMA T, et al. Squamous cell carcinoma of the endometrium with human papillomavirus type 31 and without tumor suppressor gene p53 mutation. **Gynecol Oncol**, v. 65, p. 180-184, 1997.
123. KAUFMAN DW, SHAPIRO S, SLONE D, et al. Decreased risk of endometrial cancer among oral contraceptive users. **N Engl J Med**, v. 303, p. 1045-1047, 1980.
124. KAUFMAN RH, ADAM E, KENOGLE J, et al. Relevance of human papillomavirus screening in the management of cervical intraepithelial neoplasia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 176, p. 87-92, 1997.
125. KEALY WF, ANNIS P, BARRY JA, et al. Adenoacanthoma of the endometrium: morphological changes induced by human papillomavirus. **J Clin Pathol**, v. 43, p. 554-559, 1994.
126. KEY T, PIKE M. The dose-effect relationship between "unopposed" oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. **Br J Cancer**, v. 57, p. 205-212, 1998.

127. KIM MS, SHIN KH, HWA J, et al. HPV 16, tobacco specific N-nitrosamine and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidini in oral carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 53, p. 4811-4816, 1993.
128. KITAGAWA K, YOSHIKAWA H, ONDA T, et al. Genomic organization of human papillomavirus type 18 in cervical cancer specimens. **JPN J Cancer Res**, v. 87, p. 263-268, 1996.
129. KJELLGREN O. Epidemiology and pathophysiology of corpus carcinoma. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 65, n. 5, p. 78-82, 1977.
130. KOHLER MF, BERCHUCK A, DAVIDOFF AM, et al. Overexpression and mutation of p53 in endometrial carcinoma. **Cancer Res**, v. 52, p. 1622-1627, 1992.
131. KOHLER MF, CARNEY P, DODGE R, et al. p53 overexpression in advanced-stage endometrial cancer. **Am J Obstet Gynecol**, v. 175, p. 1246-1252, 1996.
132. KOSKELA P, ANTTILA T, BJORGE T, et al. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. **Int J Cancer**, v. 85, p. 35-39, 2000.
133. KOUMANTAKI Y, TZONOU A, KOUMANTAKI E et al. A case-control study of cancer of endometrium in Athens. **Int J Cancer**, v. 43, p. 795-799, 1989.
134. KREIDER JW, HOWETT MK, WOLFE SA, et al. Morphological transformation in vivo of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. **Nature**, v. 317, p. 639-643, 1985.
135. KURMAN RJ, KAMINSKI PF, NORRIS HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long term study of untreated hyperplasia in 170 patients. **Cancer**, v. 56, p. 403-412, 1985.
136. KUWAMARA M, FUGISAKI N, KAGAWA S, et al. Determination of p53 protein and high-risk Human Papillomavirus DNA in carcinoma of the renal pelvis and ureter. **Int J Mol Med**, v. 1, n. 4, p. 703-707, 1998.
137. LAWRENCE C I, TESSARO S, DURGERIAN S et al. Smoking, body weight and early-stage endometrial cancer. **Cancer**, v. 59. p. 1665-1669, 1987.
138. LA VECCHIA C, FRANCESCHI S, DECARLI A, GALLUS G, TOGNONI G. Risk factors for endometrial cancer at different ages. **J Natl Cancer Inst**, v. 73, p. 667-671, 1984.
139. LA VECCHIA C, FRANCESCHI S, GALLUS G. Estrogens and obesity as risk factors for endometrial cancer in Italy. **Int J Epidemiol**, v. 11, p. 120-126, 1982.
140. LAI CH, HSUEH S, LIN CY, et al. Human papillomavirus in benign and malignant ovarian and endometrial tissues. **Int J Gynecol Pathol**, v. 11, p. 210-215, 1992.

141. LAYDE PM, WINGO PA, SCHLESSELMAN JJ, ORY IJW. Long-term oral contraceptive use and the risk of breast cancer: Center for Disease Control Cancer and Steroid Hormone Study. **JAMA**, v. 249, p. 1591-1594, 1983.
142. LEE MF, CHANG ML, WU CH. Detection of Human Papillomavirus types in cervical adenocarcinoma by the Polymerase Chain Reaction. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 63, n. 3, p. 265-270, 1998.
143. LEMINEN A, PAAVONEN J, VESTERINEN E, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in adenocarcinoma of the uterine cervix. **Am J Clin Pathol**, v. 95, p. 647-652, 1991.
144. LESKO SM, ROSEMBERG L, KAUFMAN DW, et al. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer. **N Engl J Med**, v. 313, p. 593-596, 1985.
145. LEVI F, FRANCESCHI S, NEGRI E, LA VECCHIA C. Dietary factors and the risk of endometrial cancer. **Cancer**, v. 71, p. 3578-3581, 1993.
146. LEVI F, LA VECCHIA C, DECARLI C. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer. **Eur J Cancer Clin Oncol**, v. 23, p. 1025-1029, 1987.
147. LEVI F, LA VECCHIA C, NEGRI E, PARIZZINI F, FRANCECCHI S. Body mass at different ages and subsequent endometrial cancer risk. **Int J Cancer**, v. 50, p. 567-571, 1992.
148. LEVINE RL, CARGILE CB, BLAZES MS, et al. PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. **Cancer Res**, v. 58, p. 3524-3528, 1998.
149. LININGER RA, WISTUBA I, GAZDAR A, et al. Human papillomavirus type 16 is detected in transitional cell carcinoma and squamotransitional cell carcinomas of the cervix and endometrium. **Cancer**, v. 83, n. 3, p. 521-527, 1998.
150. LOEB LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. **Cancer Res**, v. 54, p. 5059-5063, 1994.
151. LORINCZ A, REID R, JENSON A. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet Gynecol**, v. 79, p. 329-337, 1992.
152. LUCAS WE, YEN SC. A study of endocrine and metabolic variables in postmenopausal women with endometrial carcinoma. **Am J Obstet Gynecol**, v. 134, p. 180-186, 1979.
153. LYNCH HT, LYNCH J, CONWAY T, et al. Familial aggregation of carcinoma of the endometrium. **Am J Obstet Gynecol**, v. 171, p. 24-27, 1994.

154. MACK T-M, PIKE MC, HENDERSON DE, et al. Estrogens and endometrial cancer in a revirement community. **N Engl J Med**, v. 294, p. 1262-1267, 1976.
155. MACNAB JMC, WALKINSHAW SA, CORDIER JW. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. **N Engl J Med**, v. 315, p. 1052-1058. 1986.
156. MARIANI A, SEBO TJ, KATZMANN JA, et al. Pretreatment assessment of prognostic indicators in endometrial cancer. **Am J Obstet Gynecol**, v. 182, p. 1535-1544, 2000.
157. MATSUO N, IWASAKA T, HAYASHI Y, et al. Polymerase chain reaction analysis of human papillomavirus in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix. **Int J Gynecol Obstet**, v. 41, p. 251-256, 1993.
158. MAXWELL GL, RISINGER JJ, GUMBS C, et al. Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasia. **Cancer Res**, v. 58, p. 2500-2503, 1998.
159. MC NICOL PJ, DODD JG. Detection of human papillomavirus DNA in prostate gland tissue by using the polymerase chain reaction amplification assay. **J Clin Microbiol**, v. 28, p. 409-412, 1990.
160. MELTON JL, RASMUSSEN JE. Clinical manifestations of human papillomavirus infection in nongenital sites. **Dermatol Clin**, v. 9, n. 2, p. 219-233, 1991.
161. MIES C. Symposium: Molecular techniques in diagnostic pathology – Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. **Human Pathol**, v. 25, n. 6, p. 555-460, 1994.
162. MILDE-LANGOSCH K, BECKER G, LUNUNG T. Human papillomavirus and c-myc / c-erb B2 in uterine and vulvar lesions. **Virchows Arch**, v. 419, p. 479-485, 1991.
163. MILDE-LANGOSCHK, SCHREIBER C, BECKER G, et al. Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reaction. **Human Pathol**, v. 24, p. 590-594, 1993.
164. MILSON I, FRIBERG LG. Primary adenocarcinoma of the uterine cervix. A clinical study. **Cancer**, v. 52, p. 942-947, 1983.
165. MIRRA AP, FRANCO EL. Cancer incidence in São Paulo, Brazil. **LICR Monograph Series in Cancer Epidemiology**, vol 1, São Paulo: Ludwig Institute for Cancer Research, 1985.
166. MITTAR R, TSUTSUMI K, PATER A, PATER MM. Human papillomavirus type 16 expression in cervical keratinocytes: role of progesterone and glucocorticoid hormones. **Obstet Gynecol**, v. 81, p. 5-12, 1993.

167. MORENO V, BOSCH FX, MUÑOZ N, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: The IARC Multicentric Case-Control Study. **Lancet**, v. 359, p. 1085-1092, 2002.
168. MORGAN RJ, PERRY AC, NEWCOMB PV, et al. Investigation of oesophageal adenocarcinoma for viral genomic sequences. **Eur J Surg Oncol**, v. 23, n. 1, p. 24-29, 1997.
169. MOUGIN C, DALSTEIN V, PRETET JL, et al. Epidemiology of cervical papillomavirus infections. Recent knowledge. **Presse Med**, v. 30, n. 20, p. 1017-1023, 2001.
170. MUIR C, WATERHOUSE J, MACK T, POWELL J, WHELAN S. Cancer incidence in five continents, vol. V, **IARC Scientific Publications** n. 88, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1987.
171. MUÑOZ N, BOSCH FX, DE SAN JOSE S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 348, p. 518-527, 2003.
172. MUTTER GL, BOYNTON KA, FAQUIN WC, et al. Allelotype mapping of unstable microsatellites establishes direct lineage continuity between endometrial precancers and cancer. **Cancer Res**, v. 56, p. 4683-4686, 1996.
173. MUTTER GL, LIN MC, FITZGERALD J, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, p. 924-930, 2000.
174. MUTTER GL. International Society of Gynecological Pathologists Symposium on Endometrial Hyperplasia I. Histopathology of genetically defined endometrial precancers. **Int J Gynecol Pathol**, v. 19, n. 4, p. 301-309, 2000.
175. NAKAGAWA S, YOSHIKAWA H, ONDA T, et al. Type of human papillomavirus is related to clinical features of cervical carcinoma. **Cancer**, v. 78, p. 1935-1941, 1996.
176. NAKAMURA Y, MASHIMA Y, KAMEYAMA K, et al. Detection of human papillomavirus infection in squamous tumours of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridization and polymerase chain reaction. **Br J Ophthalmol**, v. 81, p. 308-313, 1997.
177. NEGRINI BP, SCHIFFMAN MH, KURMAN WB, et al. Oral contraceptive use, human papillomavirus infection and risk of early cytological abnormalities of the cervix. **Cancer Res**, v. 50, p. 4670-4675, 1990.
178. NIELSEN AL. Human papillomavirus type 16/18 in uterine cervical adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma. **Cancer**, v. 65, p. 2588-2593, 1990.

179. NORONHA V, MELLO W, VILLA L, et al. Papillomavirus humano asociado a lesões da cérvix uterina. **Ver Soc Bras Med Trop**, v. 32, n. 3, p. 235-240, 1999.
180. NYHOLM HCJ, NIELSEN AL, LYNDROP J, et al. Biochemical and immunohistochemical estrogen and progesterone receptors in adenomatous hyperplasia and endometrial carcinoma: correlation with stage and other clinicopathologic features. **Am J Obstet Gynecol**, v. 167, p. 1334-1342, 1992.
181. O'LEARY JJ, LANDERS RJ, CROWLEY M, et al. Genotypic mapping of HPV and assessment of EBV prevalence in endocervical lesions. **J Clin Pathol**, v. 50, n. 11, p. 904-910, 1997.
182. O'LEARY JJ, LANDERS RJ, CROWLEY M, et al. Human Papillomavirus and mixed epithelial tumor of the endometrial. **Human Pathol**, v. 29, n. 4, p. 383-389, 1998.
183. OKAGAKI T, TASE T, TWIGGS LB, CARLSON LF. Histogenesis of cervical adenocarcinoma with reference to human papillomavirus 18 as a carcinogen. **J Reprod Med**, v. 34, p. 639-644, 1989.
184. OSTROW RS, MANIAS DA, FONG WJ, et al. A survey of human cancers for human papillomavirus DNA by filter hybridization. **Cancer**, v. 59, p. 429-434, 1987.
185. PAGANINI-HILL A, ROSS RK, HENDERSON BE. Endometrial cancer and patterns of use of estrogen replacement therapy: a cohort study. **Br J Cancer**, v. 59, p. 445-447, 1989.
186. PALAN PR, MIKHAIL MD, BASU J, ROMNEY SL. Plasma levels of anti-oxidant betacarotene and alpha tocopherol in uterine cervix dysplasia and cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 15, p. 13-20, 1991.
187. PALEFSKY JM, HOLLY EA, RALSTON ML, et al. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **J Infect Dis**, v. 183, p. 383-391, 2001.
188. PARAZZINI F, LA VECCHIA C, NEGRI E, FEDELE I, BALOTTA F. Reproductive factors and risk of endometrial cancer. **Am J Obstet Gynecol**, v. 164, p. 522-527, 1991.
189. PARAZZINI F, LA VECCHIA C. Epidemiology of adenocarcinoma of the cervix. **Gynecol Oncol**, v. 39, p. 40-46, 1990.
190. PARAZZINI F, LA VECCHIA C, MORONI S, CHATENAUD L, RICCI E. Family history and the risk of endometrial cancer. **Int J Cancer**, v. 59, p. 460-462, 1994.
191. PARK DJ, WILEZYNSKI SP, PAQUETTE RL, et al. p53 mutations in HPV-negative cervical carcinoma. **Oncogene**, v. 9, p. 204-210, 1994.

192. PARK T-W, FUJIWARA H, WRIGHT TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. **Cancer**, v. 76, p. 1902-1913, 1995.
193. PARKER MF, ARROYO GF, GERADTS J, et al. Molecular characterization of adenocarcinoma of the cervix. **Gynecol Oncol**, v. 64, p. 242-251, 1997.
194. PASLOV M, LIDEGAARD O, KLINTORP S, et al. Risk factors among young women with endometrial cancer: a Danish case-control study. **Am J Obstet Gynecol**, v. 182, p. 23-29, 2000.
195. PFISTER H, FUCHS PG. Relation of papillomaviruses to anogenital cancer. **Dermatol Clin**, v. 9, p. 267-269, 1991.
196. PFISTER H. Human Papillomaviruses and Genital Cancer. **Advances in Cancer Res**, v. 48, p. 113-147, 1987.
197. PILLAI MR, NAIR MK. Development of a continued mucos syndrome and pathogenesis of human papillomavirus-associated upper aerodigestive tract and uterine cervical tumors. **Ex Mol Pathol**, v. 69, p. 233-241, 2000.
198. PINS MR, YOUNG RH, CRUM CP, et al. Cervical squamous cell carcinoma in situ with intraepithelial extension to the upper genital tract and invasion of tubes and ovaries: report of a case with human papillomavirus analysis. **Int J Gynecol Pathol**, v. 16, n. 3, p. 272-278, 1997.
199. PINTO AP. **Influência da presença de DNA de papillomavirus humano e achados anáomo-patológicos no prognóstico do carcinoma escamoso vulvar**. São Paulo, 1999. 108 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Área de Patologia, Universidade de São Paulo.
200. PORTUGAL LG, GOLDENBERG JD, WENIG BC, et al. Human papillomavirus expression and p53 gene mutations in squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 123, p. 1030-1034, 1997.
201. PRENTICE R, THOMPSON D, CLIFFORD C, et al. Dietary fat reduction and plasma estradiol concentration in healthy post-menopausal women. **J Natl Cancer Inst**, v. 82, p. 129-134, 1990.
202. RIETHDORF S, RIETHDORF L, MILDE-LANGOSCH K, et al. Differences in HPV 16 and HPV 18 E6/E7 oncogene expression between in situ and invasive adenocarcinoma of the cervix uteri. **Virchows Arch**, v. 437, p. 491-500, 2000.
203. RISINGER JJ, HAYES AK, BERCHUCK A, BARRET JC. PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. **Cancer Res**, v. 57, p. 4736-4738, 1997.

204. ROMANCZUK H, THIERRY F, HOWLEY PM. Mutational analysis of elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16p97 and type M18p105 promoters. **J Virol**, v. 64, p. 2849-2859, 1990.
205. RONDALL TC, KURMAN RJ. Progestin treatment of atypical hyperplasia and well-differentiated carcinoma of the endometrium in women under age 40. **Obstet Gynecol**, v. 90, p. 434-440, 1997.
206. RONNETT BM, MANOS MM, RANSLEY JE. Atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS): cytopathologic features histopathologic results, and human papillomavirus DNA detection. **Hum Pathol**, v. 30, p. 816-825, 1999.
207. RONNETT BM, ZAINO RJ, ELLENSON LH, KURMAN RJ. Endometrial carcinoma. In: Kurman RJ. **Blaustein's pathologies of the female genital tract**. 5th ed. Baltimore: Springer, 2002. p. 501-559.
208. ROTOLA A, MONINI P, DI LUCCA D, et al. Presence and physical state of HPV DNA in prostate and urinary tract issues. **Int J Cancer**, v. 52, p. 359-365, 1992.
209. ROZENDAAL L, WALBOOMERS JMM, VAN DER LINDEN M, et al. PCR-based high risk HPV test in cervical-cancer screening gives objective risk assessment of women with cytomorphologically normal cervical smears. **Int J Cancer**, v. 68, p. 766-769, 1996.
210. SAITO T, NAKAGIMA T, MOGI K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated protein p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 28, n. 5, p. 226-232, 1999.
211. SALAZAR DM, DE PAPP EW, BONFIGLIO TA, et al. Adenosquamous carcinoma of the endometrium. **Cancer**, v. 40, p. 119-130, 1977.
212. SALMI T. Risk factors in endometrial carcinoma with special reference to the use of estrogens. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 86, n. 5, p. 1-119, 1979.
213. SAMARATUNGA H, COX N, WRIGHT RG. Human papillomavirus DNA in glandular lesions of the uterine cervix. **J Clin Pathol**, v. 46, p. 718-721, 1993.
214. SASSON IM, HALEY NJ, HOFFMANN D, et al. Cigarette smoking and neoplasia of the uterine cervix: smoke constituents in cervical mucus. **N Engl J Med**, v. 5, p. 315-316, 1985.
215. SCHAFER A, FRIEMANN W, MIELKE M, et al. The increases frequency of cervical dysplasia in women infected with the human immunodeficiency virus is related to the degree of immunosuppression. **Am J Obstet Gynecol**, v. 164, p. 593-599, 1991.

216. SCHAKLIN DR. Endometrial carcinoma: Diagnostic criteria, pathogenesis, natural history and associations. **Pathol Annual**, v. 13, p. 233-287, 1978.
217. SCHEFFNER M, MÜNGER K, BYRNE JC, HOWLEY PM. The state of p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 5523-5527, 1991.
218. SCHIFFMAN M, BAUER H, HOOVER R, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, v. 85, p. 958-964, 1993.
219. SCHIFFMAN MH, HALEY NJ, FELTON JS, et al. Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: measuring cigarette smoke constituents in the cervix. **Cancer Res**, v. 47, p. 3886-3888, 1987.
220. SCHWARZ E, FREESE UK, GISSMANN L, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. **Nature**, v. 314, p. 314:111-114, 1985.
221. SEBBELOV A, KJORSTAD K, ABELER V, NORRILD B. The prevalence of human papillomavirus type 16 and 18 DNA in cervical cancer in different age groups: a study on the incidental cases of cervical cancer in Norway in 1983. **Gynecol Oncol**, v. 41, p. 141-148, 1991.
222. SEMCZUK A, STENZEL A, BARANOWSKI W, et al. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 in human neoplastic endometrium: lack of correlation with established prognostic factors. **Oncol Rep**, v. 7, n. 4, p. 905-910, 2000.
223. SHAPIRO S, KAUFMAN DW, SLONE D, et al. Recent and past use of conjugated estrogens in relation to adenocarcinoma of the endometrium. **N Engl J Med**, v. 303, p. 485-489, 1980.
224. SHAPIRO S, KELLY JP, ROSENBERG L, et al. Risk of localized and widespread endometrial cancer in relation to recent and discontinued use of conjugated estrogens. **N Engl J Med**, v. 313, p. 969-972, 1985.
225. SHEETS EE, YEH J. The role of apoptosis in gynaecological malignancies. **Ann Med**, v. 29, p. 121-126, 1997.
226. SHERMAN ME, BUR ME, KURMAN RJ. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. **Human Pathol**, v. 26, p. 1268-1274, 1995.
227. SHERMAN ME, STURGEON S, BRINTON LA, et al. Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinoma. **Mod Pathol**, v. 10, p. 963-968, 1997.

228. SHERMAN ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. **Mod Pathol**, v. 13, n. 3, p. 295-308, 2000.
229. SHERWOOD JB, CARLSON JA, GOLD MA, et al. Squamous metaplasia of the endometrium associated with HPV 6 and 11. **Gynecol Oncol**, v. 66, n. 1, p. 141-145, 1997.
230. SHIBATA D, ARNHEIM N, MARTIN WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. **J Exp Med**, v. 167, p. 225-230, 1988.
231. SHROYER KR. Human papillomavirus and endocervical adenocarcinoma. Editorial. **Human Pathol**, v. 24, n. 2, p. 119-120, 1993.
232. SILVERBERG SG, BOLIN MG, DE GIORGI LS. Adenoacanthoma and mixed adenosquamous carcinoma of the endometrium. A clinico-pathologic study. **Cancer**, v. 19, p. 1307-1314, 1972.
233. SILVERBERG SG, MAKOWSKI EL, ROCHE WD. Endometrial cancer in women under 40 years of age. **Cancer**, v. 39, p. 592-598. 1977.
234. SILVERBERG SG. The significance of squamous elements in carcinoma of endometrium. A Review. **Prog Surg Path**, v. 1, p. 1-39, 1981.
235. SIMONS AM, PHILLIPS DH, COLEMAN DV. Damages to DNA in cervical epithelium related to smoking tobacco. **BMJ**, v. 306, p. 1444-1448, 1993.
236. SKYLDBERG BM, MURRAY E, LAMBKIN H, et al. Adenocarcinoma of the uterine cervix in Ireland and Sweden: Human Papillomavirus infection and biologic alterations. **Mod Pathol**, v. 12, n. 7, p. 675-682, 1999.
237. SLATTERY ML, ABBOT TM, OVERALL JC, et al. Dietary vitamins A, C and E and selenium as risk factors for cervical cancer. **Epidemiology**, v. 1, p. 8-15, 1990.
238. SMITH EM, RENTIE R, THOMPSON DT, HERMRMAN WL. Association of exogenous estrogen and endometrial cancer. **N Engl J Med**, v. 293, p. 1164-1167, 1975.
239. SMITH EM, SOWERS MF, BUMS TI. Effects of smoking on the development of female reproductive cancers. **J Natl Cancer Inst**, v. 73, p. 371-376, 1984.
240. SNYDER V. March/April 2003: A look at cervical cancer. **Medscape Ob/Gyn & Women's Health**, 2003; 8(1). Disponível em www.medscape.com/viewarticle/452727. Acesso em: 05 jun 2003.
241. SREEKANTIAH C, BHARGAVA MK, SHETTY NJ. Chromosome 1 abnormalities in cervical carcinoma. **Cancer**, v. 4, p. 135-141, 1988.

242. STEENBERGEN R, KRAMER D, MEIJER CJL, et al. Telomerase suppression by chromosome 6 in a human papillomavirus type 16 immortalized keratinocyte cell line and in a cervical cancer cell line. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, p. 865-872, 2001.
243. STOCKWELL HG, LYMAN GH. Cigarette smoking and the risk of female reproductive cancer. **Am J Obstet Gynecol**, v. 157, p. 35-40, 1987.
244. STOREY A, THOMAS M, KALITA A, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**, v. 393, p. 21-26, 1998.
245. SWORN MJ, JONES H, LETCHWORTH AT, et al. Squamous intraepithelial neoplasia in an ovarian cyst, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus. **Human Pathol**, v. 26, p. 344-347, 1995.
246. SYRJÄNEN K, SYRJÄNEN S. Epidemiology of human papillomavirus infections and genital neoplasia. **Scand J Infect Dis**, v. 69, n. 5, p. 7-17, 1990.
247. TASE T, OKAGAKI T, CLARK BA, et al. Human papillomavirus DNA in glandular dysplasia and microglandular hyperplasia: Presumed precursors of adenocarcinoma of the uterine cervix. **Obstet Gynecol**, v. 73, p. 1005-1008, 1989.
248. TASHIRO H, BLAZES MS, WU R, et al. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but not in other common gynecological malignancies. **Cancer Res**, v. 57, p. 3935-3940, 1997.
249. TASHIRO H, ISACSON C, LEVINE R, et al. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. **Am J Pathol**, v. 150, p. 177-185, 1997.
250. TENTI P, PAVANELLO S, PADOVAN L, et al. Analysis and clinical implications of p53 gene mutations and human papillomavirus type 16 and 18 infection in primary adenocarcinoma of the uterine cervix. **Am J Pathol**, v. 152, p. 1057-1063, 1998.
251. TENTI P, RAMAGNOLI S, SILINI E, et al. Human Papillomavirus types 16 and 18 infection in infiltrating adenocarcinoma of the cervix: PCR analysis of 138 cases and correlation with histologic type and grade. **Am J Clin Pathol**, v. 106, n. 1, p. 52-56, 1996.
252. TESHIMA H, BEAUDENON S, KOI S, et al. Human Papillomavirus type 18 DNA sequences in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix. **Arch Gynecol Obstet**, v. 259, n. 4, p. 167-177, 1997.
253. THE CANCER AND STEROID HORMONE STUDY OF THE CENTER FOR DISEASE CONTROL AND THE NATIONAL INSTITUTE OF CHILD HEALTH AND HUMAN DEVELOPMENT. Combination oral contraceptive use and the risk of endometrial cancer. **JAMA**, v. 257, p. 796-800, 1987.

254. THE WHO COLABORATIVE STUDY OF NEOPLASIA AND STEROID CONTRACEPTIVES. Endometrial cancer and combined oral contraceptives. **Int J Epidemiol**, v. 17, p. 263-269, 1988.
255. TOGAWA K, JASKIEWICZ K, TAKAHASHI H, et al. Human papillomavirus DNA sequences in esophagus squamous cell carcinoma. **Gastroenterology**, v. 107, p. 128-136, 1994.
256. TOH Y, KUWANO H, TANAKA S, et al. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. **Cancer**, v. 70, p. 2234-2238, 1992.
257. TOKI T, KURMAN RJ, PARK JS, et al. Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using in situ hybridization and polymerase chain reaction. **Int J Gynecol**, v. 10, p. 107-125, 1991.
258. TREVATHAN E, LAYDE P, WEBSTER LA, et al. Cigarette smoking and dysplasia and carcinoma in situ of the uterine cervix. **JAMA**, v. 250, p. 499-502, 1983.
259. TROTTIER AM, Provencier D, Mes-Masson AM, et al. Absence of human papillomavirus sequences in ovarian pathologies. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 1011-1013, 1995.
260. TSAO SW, MOK SC, FEY EG, et al. Characterisation of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORF6). **Exp Cell Res**, v. 218, p. 499-507, 1995.
261. TSEN GL, GURPIRE E. Induction of human estradiol dehydrogens by progestins. **Endocrinology**, v. 97, p. 25-29, 1975.
262. TSENG CJ, LIN CY, WANG RL, et al. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. **Am J Obstet Gynecol**, v. 166, p. 35-40, 1992.
263. TSENG CJ, PAO CC, LIN J-D, et al. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis. **J Clin Oncol**, v. 17, p. 1391-1396, 1999.
264. TSUHAKE K, NAKAZATO I, HIRAYASU T, et al. Human Papillomavirus DNA in adenosquamous carcinoma of the lung. **J Clin Pathol**, v. 51, n. 10, p. 741-749, 1998.
265. TSUNOKAWA Y, TAKEBE N, NOZAWA S, et al. Presence of human papillomavirus type 16 and type 18 DNA sequences and their expression in cervical cancers and cell lines from Japanese patients. **Int J Cancer**, v. 37, p. 499-503, 1986.

266. TYLER CW JR, WEBSTER LA, ORY HW, RUBIN G, Endometrial cancer: how does cigarette smoking influence the risk of women under age 55 years having this tumor ? **Am J Obstet Gynecol**, v. 151, p. 899-905, 1985.
267. UCHIYAMA M, IWASAKA T, MATSUO N, et al. Correlation Between Human Papillomavirus positivity and p53 gene overexpression in adenocarcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Oncol**, v. 65, n. 1, p. 23-29, 1997.
268. URSIC-URSCAJ M, KOVACIC J, POLJAK M, MARIN J. Association of risk factors for cervical cancer and human papilloma viruses in invasive cervical cancer. **Eur J Gynaec Oncol**, v. 17, n. 5, p. 368-371, 1996.
269. VAN LEEUWEN FE, BENRAADT J, COEBERGH JWW, et al. Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer. **Lancet**, v. 343, p. 448-452, 1994.
270. VERRAULT R, CHU J, MANDELSON M, SHY K. A case control study of diet and invasive cervical cancer. **Int J Cancer**, v. 43, p. 1050-1054, 1989.
271. VILLA LL. Biología molecular: conceitos e principios básicos. In: MARTINS NV e PEREYRA EAG. **Conhecendo o HPV**. São Paulo: Frontis, 2000, p. 137-143.
272. VILLA LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv Cancncer Res**, v. 71, p. 321-341, 1997.
273. VILLA LL. Técnica de extração de DNA a partir de material parafinado e da Reação em Cadeia da polimerase. **Comunicação Pessoal**, 2001.
274. VOIGHT LF, WEISS NS, CHU J, et al. Progestagen supplementation of exogenous oestrogens and risk of endometrial cancer. **Lancet**, v. 338, p. 274-277, 1991
275. WALBOOMERS JMM, JACOBS MV, MANOS MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**, v. 189, p. 12-19, 1999.
276. WALKER J, BLOSS JD, LIAD SY, et al. HPV genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. **Obstet Gynecol**, v. 74, p. 781-785, 1989.
277. WANK R, THOMSEN C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQW3. **Nature**, v. 352, p. 723-725, 1991.
278. WEBSTER K, TAYLOR A, GASTON K. Oestrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by the human papillomavirus type 16 E2 and E7 proteins. **J Gen Virol**, v. 82, p. 201-213, 2001.
279. WEIR HK, SLOAN M, KREIGER N. The relationship between cigarette smoking and the risk of endometrial neoplasms. **Int J Epidemiol**, v. 23, p. 261-266, 1994.

280. WEISS NS, FAREWELL VT, SZEKELY DR, et al. Estrogens and endometrial cancer: effect of other risk factors on the association. **Maturitas**, v. 2, p. 185-190, 1980.
281. WEISS NS, SAYUETZ TA. Incidence of endometrial cancer in relation to the use of oral contraceptives. **N Engl J Med**, v. 302, p. 551-554, 1980.
282. WEISS NS, SZEKELY DR, ENGLISH DR, SCHWEID AI. Endometrial cancer in relation to patterns of menopausal estrogen use. **JAMA**, v. 242, p. 261-264, 1979.
283. WERNES BA, LEVINE AJ, HOWLEY PM. Association of human papillomaviruses types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, p. 76-79, 1990.
284. WESTHOFF C, HELLER D, DROSINOS S, TANCER L. Risk factors for hyperplasia-associated versus atrophy-associated endometrial carcinoma. **Am J Obstet Gynecol**, v. 182, p. 506-508, 2000.
285. WHANG JD, LEE J-H. Molecular genetics of gynecologic cancer. **JKMS**, v. 12, p. 383-389, 1997.
286. WHITEHEAD N, REYNER F, LINDBAUM J. Megaloblastic changes in cervical epithelium: association with oral contraceptive therapy and reversal with folic acid. **JAMA**, v. 267, p. 528-533, 1992.
287. WIENER JS, WACHTER PJ. Human papillomaviruses II: association of HPV with GU malignancies at multiple sites. **Infect Urol**, v. 8, n. 6, p. 165-170, 1995.
288. WILEZYNSKI SP, OFT M, COOK N, et al. Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. **Human Pathol**, v. 24, p. 96-102, 1993.
289. WILEZYNSKI SP, WALKER J, LIAO S, et al. Adenocarcinoma of the cervix associated with human papillomavirus. **Cancer**, v. 62, p. 1331-1336, 1988.
290. WILLET W, STAPFER MJ, BAIN C, et al. Cigarette smoking: relative weight and menopause. **Am J Epidemiol**, v. 117, p. 651-658, 1983.
291. WINKELSTEIN W Jr. Smoking and cervical cancer – current status: a review. **Am J Epidemiol**, v. 131, p. 945-957, 1990.
292. WONG WS, WONG YF, TAM OS, et al. Detection of human papillomavirus (HPV) in paraffin embedded tissues of endometrial carcinoma. **Aust N Z J Obstet Gynecol**, v. 33, p. 180-182, 1993.
293. WRIGHT TC JR, ELLERBROCK TU, CHIASSON MA, et al. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus. **Obstet Gynecol**, v. 84, p. 591-597, 1994.

294. YAGER JD, LIEHR JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, v. 36, p. 203-232, 1996.
295. YAMAKAWA Y, FORSLUND O, TESHIMA H, et al. Human papillomavirus DNA in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix detected by polymerase chain reaction. **Gynecol Oncol**, v. 53, p. 190-195, 1994.
296. YEE C, KRISHNAN-HEWLETT I, BAKER C, et al. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. **Am J Pathol**, v. 119, p. 361-366, 1985.
297. YLITALO N, SORENSEN P, JOSEFSSON A, et al. Smoking and oral contraceptives as risk factors for cervical carcinoma in situ. **Int J Cancer**, v. 81, p. 357-365, 1999.
298. YOUNG LS, REVAN IS, JOHNSON MA. The polymerase chain reaction: a new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. **Br Med J**, v. 298, p. 14-18, 1999.
299. ZENILMAN JM. Chlamydia and cervical cancer- Editorial. **JAMA**, v. 285, p. 81-83, 2000.
300. ZEMLA B, GUMINSKI S, BANASIK R. Study of risk factors in invasive cancer of the corpus uteri. **Neoplasma**, v. 33, p. 621-629, 1986.
301. ZIMNA K, POREBA E, KEDZIA W, et al. Human papillomavirus (HPV) in upper genital tract carcinomas of women. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 18, n. 5, p. 415-417, 1997.
302. ZUR HAUSEN H. Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between virus infection and initiating events ? **Lancet**, v. ii, p. 1370-1372, 1982.
303. ZUR HAUSEN H. Intracellular surveillance of persisting viral infection: human genital cancer resulting from a failing cellular control of papillomavirus gene expression. **Lancet**, v. ii, p. 489-491, 1986.